

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平11-503616

(43) 公表日 平成11年(1999) 3月30日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
C 1 2 N 15/00	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	
A 6 1 K 35/74		A 6 1 K 35/74	D
38/00	A D T	48/00	A B J
48/00	A B J	C 0 7 K 14/715	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 294 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平9-523861	(71) 出願人	アムジエン・インコーポレーテッド アメリカ合衆国、カリフォルニア・91320 -1789、サウザンド・オークス、デハビル ランド・ドライブ・1840、アムジエン・セ ンター
(86) (22) 出願日	平成8年(1996)12月20日	(72) 発明者	ボイル, ウィリアム・ジェイ アメリカ合衆国、カリフォルニア、ムーア パーク、チエストナツト・リツジ・ストリ ート・11678
(85) 翻訳文提出日	平成9年(1997) 8月15日	(72) 発明者	レイシー, デイビット・エル アメリカ合衆国、カリフォルニア、サウザ ンド・オークス、パセオ・ビスタ・614
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 6 / 2 0 6 2 1	(74) 代理人	弁理士 川口 義雄 (外 2 名) 最終頁に続く
(87) 国際公開番号	W O 9 7 / 2 3 6 1 4		
(87) 国際公開日	平成9年(1997) 7月3日		
(31) 優先権主張番号	0 8 / 5 7 7, 7 8 8		
(32) 優先日	1995年12月22日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(31) 優先権主張番号	0 8 / 7 0 6, 9 4 5		
(32) 優先日	1996年9月3日		
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		

(54) 【発明の名称】 オステオプロテゲリン

(57) 【要約】

本発明は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーのメンバーであって、骨代謝の調節に関与するオステオプロテゲリンと呼ばれる分泌ポリペプチドを開示する。また、オステオプロテゲリンをコードする核酸、ポリペプチド、組換えベクターおよび発現のための宿主細胞、O P G に結合する抗体、および医薬組成物を開示する。該ポリペプチドは骨粗鬆症のごとき増大された再吸収によって特徴付けられる骨疾患を治療するのに使用される。

【特許請求の範囲】

1. OPGの生物学的活性のうち少なくとも1つを含むポリペプチドをコードする単離された核酸であって、該核酸が：

(a) 図2B-2C（配列番号：120）、9A-9B（配列番号：122）、および9C-9D（配列番号：124）で示される核酸またはその相補的鎖；

(b) 図2B-2C（配列番号：120）、9A-9B（配列番号：122）、および9C-9D（配列番号：124）で示されるペプチド-コーディング領域とストリンジェント条件下でハイブリダイズする核酸；

(c) 包括的に図1Aに示されたヌクレオチド148ないし337とストリンジェント条件下でハイブリダイズする核酸；および

(d) (a)、(b) および (c) の核酸に対して縮重した核酸；
よりなる群から選択される該単離された核酸。

2. cDNA、ゲノミックDNA、合成DNAまたはRNAである請求項1記載の核酸。

3. 請求項1記載の核酸によってコードされたポリペプチド。

4. エシェリキア・コリ (*Escherichia coli*) 発現に好ましい1以上のコドンを含む請求項1記載の核酸。

5. それに結合した検出可能な標識を有する請求項1記載の核酸。

6. 図2B-2C（配列番号：120）、9A-9B（配列番号：122）、および9C-9D（配列番号：124）のポリペプチド-コーディング領域を含む請求項1記載の核酸。

7. ヌクレオチド158-1297からの図9C-D（配列番号：124）で示された配列を有する請求項6記載の核酸。

8. 請求項1記載の核酸を含む発現ベクター。

9. 該核酸が図9C-9D（配列番号：124）で示されたポリペプチド-コーディング領域を含む請求項8記載の発現ベクター。

10. 請求項8記載の発現ベクターで形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞。

11. 真核生物細胞である請求項10記載の宿主細胞。
12. CHO、COS、293、3T3、CV-1およびBHK細胞よりなる群から選択される請求項11記載の宿主細胞。
13. 原核生物細胞である請求項10記載の宿主細胞。
14. エシェリキア・コリ (Escherichia coli) である請求項13記載の宿主細胞。
15. 請求項8記載の発現ベクターを含むトランスジェニック哺乳動物。
16. 齧歯類である請求項15記載のトランスジェニック哺乳動物。
17. マウスである請求項16記載のトランスジェニック哺乳動物。
18. 適当な栄養条件下で、請求項1記載の核酸で形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞を増殖させ；次いで、
該核酸の発現のポリペプチド産物を単離することを特徴とするOPGの生産方法。
19. OPGを含む精製され単離されたポリペプチド。
20. 哺乳動物OPGである請求項19記載のポリペプチド。
21. ヒトOPGである請求項20記載のポリペプチド。
22. 実質的に他のヒト蛋白質を含まない請求項19記載のポリペプチド。
23. 図2B-2C（配列番号：121）、9A-9B（配列番号：123）、および9C-9D（配列番号：125）で示されるアミノ酸配列を有する請求項21記載のポリペプチドまたはその誘導体。
24. 包括的に残基22-401からの図9C-9D（配列番号：125）で示されるアミノ酸配列を有する請求項23記載のポリペプチド。
25. 包括的に残基32-401からの図9C-9D（配列番号：125）で示されるアミノ酸配列を有する請求項23記載のポリペプチド。
26. 外因性DNA配列の発現の産物であることによって特徴付けられる請求項19記載のポリペプチド。
27. 該DNAがcDNA、ゲノミックDNAまたは合成DNAである請求項

26記載のポリペプチド。

28. 水溶性ポリマーで修飾されている請求項19記載のポリペプチド。

29. 該水溶性ポリマーがポリエチレングリコールである請求項28記載のポリペプチド。

30. 腫瘍壊死因子受容体細胞外領域のシステインリッチドメインに特徴的な4つのシステイン-リッチドメインを含む少

なくとも約164アミノ酸のアミノ酸配列；および増大した骨密度の活性を含むポリペプチド。

31. 残基22のアミノ末端を有する図2B-2C（配列番号：121）、9A-9B（配列番号：123）または9C-9D（配列番号：125）で示されるアミノ酸配列を含み、1ないし216アミノ酸がカルボキシル末端から欠失されているポリペプチド。

32. 包括的に残基22-185、22-189、22-194、または22-201からのアミノ酸配列を含む請求項31記載のポリペプチド。

33. さらにカルボキシル末端から伸びるヒトIgG1のFc領域を含む請求項32記載のポリペプチド。

34. 残基22のアミノ末端を有する図2B-2C（配列番号：121）、9A-9B（配列番号：123）または9C-9D（配列番号：125）で示されるアミノ酸配列を含み、1ないし10アミノ酸がアミノ末端から欠失されており、所望により1ないし216アミノ酸がカルボキシル末端から欠失されていてもよいポリペプチド。

35. 包括的に残基27-185、27-189、27-1

94、27-401、または32-401からのアミノ酸配列を含む請求項34記載のポリペプチド。

36. さらに、カルボキシル末端から伸びるヒトIgG1のFc領域を含む請求項35記載のポリペプチド。

37.

h u O P G [2 2 - 2 0 1] - F c 、
 h u O P G [2 2 - 4 0 1] - F c 、
 h u O P G [2 2 - 1 8 0] - F c 、
 h u O P G m e t [2 2 - 4 0 1] - F c 、
 h u O P G F c - m e t [2 2 - 4 0 1] 、
 h u O P G m e t [2 2 - 1 8 5] 、
 h u O P G m e t [2 2 - 1 8 9] 、
 h u O P G m e t [2 2 - 1 9 4] 、
 h u O P G m e t [2 7 - 1 8 5] 、
 h u O P G m e t [2 7 - 1 8 9] 、
 h u O P G m e t [2 7 - 1 9 4] 、
 h u O P G m e t [3 2 - 4 0 1] 、
 h u O P G m e t - l y s [2 2 - 4 0 1] 、
 h u O P G m e t [2 2 - 4 0 1] 、

h u O P G m e t [2 2 - 4 0 1] - F c (P 2 5 A) 、
 h u O P G m e t [2 2 - 4 0 1] (P 2 5 A) 、
 h u O P G m e t [2 2 - 4 0 1] (P 2 6 A) 、
 h u O P G m e t [2 2 - 4 0 1] (P 2 6 D) 、
 h u O P G m e t [2 2 - 1 9 4] (P 2 5 A) 、
 h u O P G m e t [2 2 - 1 9 4] (P 2 6 A) 、
 h u O P G m e t m e t - (l y s) ₃ [2 2 - 4 0 1] 、
 h u O P G m e t m e t - a r g - g l y - s e r - (h i s) ₆ [2 2
 - 4 0 1]

よりなる群から選択されるポリペプチド。

38. 請求項37記載のポリペプチドをコードする核酸。

39. O P G に特異的に結合する抗体またはその断片。

40. モノクローナル抗体である請求項39記載の抗体。

41. O P G への抗体の結合を可能とする条件下で請求項39記載の抗体と共

に試料をインキュベートし；次いで、

結合した抗体を検出することを特徴とする生物学的試料中のOPGの存在を検出する方法。

42. 結合を可能とする条件下で候補物質と共にOPGをインキュベートし；次いで、

結合物質を測定することを特徴とするOPGに結合する候補物質の能力を評価する方法。

43. OPGをコードする核酸で動物を修飾することを特徴とする動物においてOPGのレベルを調節する方法。

44. 該核酸がOPGの組織レベルにおける増加を促進する請求項43記載の方法。

45. 該動物がヒトである請求項44記載の方法。

46. 医薬上許容される担体、アジュバント、可溶化剤、安定化剤および／または抗酸化剤中の治療上有効量のOPGを含む医薬組成物。

47. 該OPGがヒトOPGである請求項46記載の組成物。

48. 該OPGが図9Bで示されるアミノ酸配列を有する請求項47記載の組成物。

49. 治療上有効量の請求項19記載のポリペプチドを投与することを特徴とする骨障害を治療する方法。

50. 該ポリペプチドがヒトOPGである請求項49記載の方法。

51. 該骨障害が過剰な骨喪失である請求項49記載の方法。

52. 該骨障害が骨粗鬆症、骨のパジエット病、高カルシウ

ム血症、副甲状腺機能亢進症、ステロイドー誘発骨減少症、慢性関節リウマチによる骨喪失、骨髄炎による骨喪失、骨溶解転移、および歯周骨喪失よりなる群から選択される請求項51記載の方法。

53. さらに、骨形態発生蛋白質BMP-1ないしBMP-12、TGF- β ファミリーのメンバー、IL-1阻害剤、TNF α 阻害剤、副甲状腺ホルモンお

およびそのアナログ、副甲状腺ホルモン関連蛋白質およびそのアナログ、Eシリーズのプロスタグランジン、ビスホスホネート、および骨増強性ミネラルよりなる群から選択される物質の治療上有効量を投与することを特徴とする請求項49記載の方法。

54. 複数のオステオプロテグリンモノマーよりなるオステオプロテグリン多量体。

55. ダイマーである請求項54記載の多量体。

56. 鎖内ジスルフィド結合によって形成された請求項54記載の多量体。

57. ヒトIgG1に由来するのFc領域との組合せによって形成された請求項54記載の多量体。

58. オステオプロテグリンモノマーおよび不活性な多量体

を実質的に含まない請求項54記載の多量体。

59. 該モノマーが残基22-401からの図9C-9D [配列番号: 125] で示されるアミノ酸配列を含む請求項54記載の多量体、またはその誘導体。

60. 該モノマーが残基22-194からの図9C-9D [配列番号: 125] で示されるアミノ酸配列を含む請求項54記載の多量体。

【発明の詳細な説明】オステオプロテゲリン発明の分野

本発明は、一般に、骨代謝の調節に関与するポリペプチドに関する。さらに詳しくは、本発明は、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーのメンバーであるオステオプロテゲリンと呼ばれる新規なポリペプチドに関する。該ポリペプチドは骨粗鬆症のごとき骨喪失の増大によって特徴付けられる骨の病気を治療するのに用いられる。

発明の背景

ポリペプチド成長因子およびサイトカインは分泌因子であって、別々の表面結合受容体に特異的に結合することによって、細胞増殖、分化および代謝における広範囲の変化をシグナル化する。蛋白質のクラスとして、受容体はそれらの構造およびシグナル変換の様式が異なる。それらは、リガンド結合に関与する細胞外ドメイン、および適当な細胞内シグナルを伝達する細胞質ドメインを有することによって特徴付けられる。受容体発現パターンは、最終的には、いずれの細胞が所与のリガンドに応答するかを決定し、所与の受容体の構造はリガンド結合によ

って誘導された細胞応答を指示する。蛋白質チロシン、または蛋白質セリン／トレオニンのリン酸化を活性化することによって（例えば、血小板由来成長因子受容体（PDGFR）またはトランスフォーミング成長因子- β 受容体-I（TGFR-I））、G-プロテイン活性化を刺激することによって（例えば、 β -アドレナリン受容体）、および細胞質シグナル変換蛋白質との会合を調節することによって（例えば、TNFR-1およびFas/APO）、受容体はそれらの細胞質ドメインを介して細胞内シグナルを伝達することが示されている（Heldin, Cell 80, 213-223 (1995)）。

腫瘍壊死因子受容体（TNFR）スーパーファミリーはI型膜貫通蛋白質の群であり、細胞内ドメインにおいて3ないし6回反復される保存されたシステイン-リッチのモチーフを有する（Smithら Cell 76, 953-962 (1994)）。押しなべて、これらの反復単位はこれらの受容体のリガンド結

合ドメインを形成する (Chenら, *Chemistry* 270, 2874-2878 (1995))。これらの受容体のリガンドは、構造的に、TNF α に相同な蛋白質の関連群である (Goeddelら, *Cold Spring*

Harbor Symp. Quart. Biol. 51, 597-609 (1986); Nagataら *Science* 267, 1449-1456 (1995))。TNF α は区別されるが密接に関連した受容体TNFR-1およびTNFR-2に結合する。TNF α は、増殖、分化、および細胞傷害およびアポトーシスを含めた、受容体担持細胞における種々の生物学的応答を生起する (Beutlerら, *Ann. Rev. Biochem.* 57, 505-518 (1988))。

TNF α は急性および慢性炎症反応を媒介すると信じられている (Beutlerら, *Ann. Rev. Biochem.* 57, 505-508 (1988))。TNF α の全身送達は無菌性ショックおよび広範な組織壊死を誘導する。このため、TNF α は敗血症を含めた、種々の感染性疾患に関連したひどい発病率および死亡率の原因であり得る。TNFR-関連受容体Fas/APOのリガンドであるFasLにおける突然変異 (Sudaら, *Cell* 75, 1168-1178 (1993))は自己免疫に関連するが (Fisherら *Cell* 81, 935-946 (1995))、FasLの過剰生産は薬物誘導肝炎に関係している可能性がある。かくして、種々のTNF

R-関連蛋白質に対するリガンドは、しばしば、多くの病気状態のひどい効果を媒介し、これはこれらのリガンドの活性を中和する薬剤が治療的価値を有することを示唆する。可溶性TNFR-1受容体、およびTNF α に結合する抗体が、全身TNF α を中和するそれらの能力についてテストされている (Loetscherら, *Cancer Cells* 3 (6), 221-226 (1991))。分泌TNFR-1 mRNAの天然に生じる形態が最近クローン化され、その産物がイン・ビトロおよびイン・ビボでTNF α 活性を中和するその能力につきテストされた (Kohnら *PNAS USA* 87, 8331-8335

(1990))。TNF α を中和するこの蛋白質の能力は、可溶性TNF受容体がTNFに結合し、それを一掃するように機能し、それにより、TNFR-担持細胞に対する細胞傷害効果をブロックすることを示唆している。

本発明の目的は、TNFRスーパーファミリーの新しいメンバーを同定することにある。新しいファミリーメンバーは、膜貫通蛋白質、または細胞外ドメインを含み膜貫通および細胞質ドメインを欠くその可溶性形態であろうことが期待される。本発明者らは、TNFR-2に密接に関連した分泌蛋白質をコー

ドするTNFRスーパーファミリーの新しいメンバーを同定した。可溶性TNFR-1に対する類似性により、TNFR-2関連蛋白質はそのリガンドの活性を負に調節し、かくして、ある種のヒト疾患の治療で有用であり得る。

発明の概要

腫瘍壊死因子受容体(TNFR)スーパーファミリーの新規なメンバーは胎児ラット腸cDNAライブラリーから同定された。全長cDNAクローンが得られ、配列決定された。トランスジェニックマウスにおけるラットcDNAの発現により、特に長骨、骨盤骨および椎骨において、骨密度の顕著な増加が明らかとされた。該cDNAによってコードされたポリペプチドはオステプロテゲリン(OPG)と呼ばれ、骨蓄積を促進する役割を演じる。

本発明は、OPGの生物学的活性の少なくとも1つを有するポリペプチドをコードする核酸を提供する。図2B-2C(配列番号:120)、9A-9B(配列番号:122)、および9C-9D(配列番号:124)に示すマウス、ラットまたはヒトOPGをコードする核酸にハイブリダイズする核酸も提供される。好ましくは、OPGは哺乳動物OPGであって、より

好ましくはヒトOPGである。また、組換えOPGを産生する方法として、OPGを発現させるための組換えベクターおよび宿主細胞も含まれる。該ポリペプチドに特異的に結合する抗体またはその断片も開示される。

また、骨疾患を治療する方法も本発明によって提供される。該ポリペプチドは骨吸収を防止するのに有用であり、骨粗鬆症、高カルシウム血症、骨のパジェッ

ト病、および慢性関節リウマチまたは骨髄炎等による骨喪失のごとき骨喪失の結果となるいずれの疾患を治療するのにも有用である。また、本発明の核酸を用い、アンチセンスまたは遺伝子治療で骨疾患を治療することもできる。OPG核酸およびポリペプチドよりなる医薬組成物も含まれる。

図面の記載

図1. A. 新規EST LORFのFASTA分析。ヒトTNFR-2配列と並べた推定FRI-1アミノ酸配列を示す。B. 示された新規EST LORFのプロフィール分析はTNFR-プロフィールと並べた推定FRI-1アミノ酸配列である。C. 新規FRI-1に相同な領域を示すTNFRスーパーファミリーの構造図。

図2. 全長ラットOPG遺伝子、TNFRスーパーファミリーの新規メンバー、の構造および配列。A. pMOB-B1.1インサートのマップ。ボックスはcDNA配列内のLORFの位置を示す（太線）。黒色ボックスはシグナルペプチドを示し、灰色エリプシスはシステイン-リッチ反復配列の位置を示す。B. C. ラットOPG cDNAの核酸および蛋白質配列。予測されるシグナルペプチドには下線を施し、N-結合糖鎖付加の可能な部位は太い下線を施した文字で示す。D、E. OPGとTNFRスーパーファミリーの他のメンバー、fas（配列番号：128）；tnfr1（配列番号：129）；stu-t2（配列番号：130）；tnfr2（配列番号：131）；cd40（配列番号：132）；osteo（配列番号：133）；ngfr（配列番号：134）；ox40（配列番号：135）；41bb（配列番号：136）とのパイルアップ配列比較（Wisconsin GCG Package, Version 8.1）。

図3. 予測されるラットOPG蛋白質配列のPeppPlot分析（Wisconsin GCG Package, Version 8.1）。A. 疎水性（上方）および親水性（下

方）アミノ酸を示すラットOPGの模式的表示。また、塩基性（上方）および酸

性（下方）アミノ酸も示される。B. ChouおよびFasman (Adv. Enz. 47, 45-147 (1948)) によって定義されたベーターシート形成性（上方）およびベーターシート破壊性（下方）であるアミノ酸残基の表示。C. アルファラセンおよびベーターシートについての性質測定の表示（ChouおよびFasman、前掲）。1.00の上方の曲線はアルファラセンまたはベーターシート構造についての性質を示す。構造は曲線が1.00よりも降下する蛋白質の領域で終了するであろう。D. アルファ形成性（上方）またはアルファ破壊性（下方）である残基の表示。E. アルファおよびベータ構造のアミノ末端で典型的に見い出される配列に似ている蛋白質配列の一部の表示（ChouおよびFasman、前掲）。F. アルファおよびベータ構造のカルボキシル末端で典型的に見い出される配列に似ている蛋白質配列の一部の表示（ChouおよびFasman、前掲）。G. ターンで典型的に見い出される蛋白質配列の一部の表示（ChouおよびFasman、前掲）。H. 配列の各位置におけるラセン疎水性モーメントの表示（Eisenbe

rgらProc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 140-144 (1984))。I. KyteおよびDoolittle (J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982)) およびGoldmanら (Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 15, 321-353 (1986)) に基づく平均ハイドロパシーの表示 (Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem. 15, 321-353 (1986) に総括されている)。

図4. ヒト組織におけるOPG cDNAについてのmRNA発現パターン。ノーザンブロットは³²P-標識ラットcDNAインサート（A、左側の2つのパネル）、またはヒトcDNAインサート（B、右側パネル）でプローブした。

図5. 肝細胞でOPG cDNAを発現するトランスジェニックマウスの創製。マウス肝臓におけるHE-OPGトランスジーン発現のノーザンブロット発現。

図6. OPGトランスジェニックマウスにおける骨密度の増加。パネルA-

F。対照マウス。G-J、OPG発現マウス。壊死において、全ての動物をX線撮影に付し、写真を調製した。A-Fにおいて、対照動物および1のトランスジェニック

非発現体（#28）のX線写真を示す。骨は明瞭に規定される骨および透明な中央の骨髓腔を有することに注意されたし。対照的に、OPG（G-J）動物ははっきりとしない皮質および骨髓ゾーンにおける増大した密度を有する。

図7. OPGトランスジェニックマウスにおける柱状骨（trabecular bone）の増加。A-D. 対照動物からの骨の代表的な顕微鏡写真。AおよびBにおいては、大腿の低（4×、10×）出力像が示される（Masson Trichrome染色）。酒石酸耐性酸性ホスファターゼ（TRAP）についての染色は、軟骨（C）および柱状骨（D）を共に吸収する破骨細胞（矢印参照）を示す。柱状骨の上の平らな外見の破骨細胞に注目されたい。E-H. OPG-発現動物からの骨の代表的な顕微鏡写真。EおよびFにおいて、大腿の低（4×、10×）出力像が示される（Masson Trichrome染色）。明瞭な領域は増殖プレート軟骨であり、青色染色領域は骨であって、赤色領域は骨髓である。対照とは対照的に、柱状骨は吸収されず、通常 of 骨髓腔の不存在的結果となることに注意されたい。また、得られた柱状骨は青色で明瞭な領域を持つまだらな外観を有する。明瞭な領域は決して再構築されない

増殖プレート軟骨の残骸である。TRAP染色に基づくと、これらの動物は増殖プレート（G）に破骨細胞（矢印参照）を有し、これは数が減少し得る。しかしながら、増殖プレートからの柱状骨の表面は実質的に破骨細胞を欠き（H）、対照動物と直接的コントラストをなす（D参照）。

図8. HE-OPG発現体は単球-マクロファージ生成において欠陥を有しない。マウスにおける大理石骨病の1つの原因はM-CSF遺伝子における点突然変異による欠陥M-CSF産生である。この結果、循環および組織ベースのマクロファージの顕著な不足となる。OPG発現体の末梢血液はH1E分析によって評価して単球を含有した。組織マクロファージの存在を確認するために、ネズ

ミマクロファージ上の細胞表面抗原を認識するF480抗体を用いて免疫組織化学を行った。AおよびCは正常およびCR1過剰発現体からの脾臓の低出力（4×）顕微鏡写真を示す。両動物は多数のF480陽性細胞を有することに注意された。また、単球-マクロファージも正常（B）およびHE-OPG過剰発現体（D）の骨髄に存在した（40×）。

図9. マウスおよびヒトOPG cDNAクローンの構造お

よび配列。予測されるシグナルペプチドに下線を施し、N-結合糖鎖付加の可能な部位は太線で示す。E、F. ラット、マウスおよびヒトOPGアミノ酸配列の配列並置および比較。

図10. TRAP-1およびヒトOPGの細胞外における保存配列の比較。実施例6に記載したTNFR1およびOPG並置のPrettyPlot (Wisconsin GCG Package, Version 8.1)。頂部の線、ドメイン1-4をコードするヒトTNFR1配列。底部の線、ドメイン1-4をコードするヒトOPG配列。保存残基は矩形ボックスによって強調する。

図11. ヒトOPGの3次元表示。ヒトTNF β （細い線）と共結晶化した、ヒトOPG残基25ないし163の予測される3次元構造（太い線）のMolscript表示の側面図。方位の参照として、OPGポリペプチド骨格に沿った太矢印はN-末端からC-末端方向に向いている。個々のシステイン残基側鎖の位置は、別々のシステイン-リッチのドメインを示すのを助けるためにポリペプチド骨格に沿って挿入する。TNF β 分子はBannerら（1993）によって記載されているごとくに配置した。

図12. システイン-リッチのドメインの構造。OPGの予測される構造を強調するヒト（頂部線 配列番号：136）およびマウス（底部線）OPGアミノ酸配列の配列。ポリペプチドは2つの半分物に、N-末端（A）およびC-末端（B）に分けられる。N-末端の半分は4つのシステインリッチドメイン（標識した1-4）を含有することが予測される。予測される鎖内ジスルフィド結合は太線（「SS1」、「SS2」、または「SS3」標識）によって示される。

チロシン 28 およびヒスチジン 75 (下線) はイオン性相互作用を形成すると予測される。OPG リガンドと相互作用すると予測されるアミノ酸は適当な残基の上方の太点によって示される。OPG の C-末端半分に位置するシステイン残基は矩形ボックスによって示される。

図 13. 全長および切形 (truncated) マウス OPG-Fc 融合蛋白質の発現および分泌。A. ヒト IgG1-Fc ドメインへの融合点を示すマップは矢印の頭によって示される。B. F1, Fc (ロイシン 401 において Fc に融合した全長 OPG) または CT, Fc (チロシン 180 において Fc に融合したカルボキシル末端切形 OPG) 融合蛋白質発現ベクタ

ーいすれかのを発現する細胞から得られた馴化培地の SDS-ポリアクリルアミドゲルの銀染色。レーン 1、親 pCEP4 発現ベクター細胞系；レーン 2、F1, Fc ベクター細胞系；レーン 3、CT, Fc ベクター細胞系。C. 抗-ヒト IgG1-Fc ドメイン (Pierce) でプローブした F1, Fc および CT, Fc 融合蛋白質発現ベクターのウェスタンブロット。レーン 1、親 pCEP4 発現ベクター細胞系；レーン 2、F1, Fc ベクター細胞系；レーン 3、CT, Fc ベクター細胞系。

図 14. イー・コリ (E. coli) におけるヒト OPG の発現。A. 細菌発現ベクターの構築。ヒト OPG 遺伝子の LORF は PCR によって増幅し、次いで、オリゴヌクレオチドリンカー断片 (頂部ストランドは配列番号: 137; 底部ストランドは配列番号: 127) に結合させ、pAMG21 ベクター DNA に連結した。得られたベクターは N-末端メチオニン残基に連結した OPG 残基 32-401 を発現できる。B. pAMG21-ヒト OPG-32-401 プラスミドを保有する誘導されないおよび誘導された細菌の SDS-PAGE 分析。レーン 1、MW 標準；レーン 2、誘導されない細菌；レーン 3、30℃ 誘導；レーン 4、37℃ 誘導；レーン 5、37℃ 誘導か

らの全細胞溶解物；レーン 6、全細胞溶解物の可溶性画分；7、全細胞溶解物の不溶性画分；レーン 8、全細胞溶解物から得られた精製封入体。

図15. SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングによる、CHO細胞において産生された組換えネズミOPGの分析。等量のCHO馴化培地を示した各レーンに適用し、還元性試料緩衝液（左側レーン）、または非還元性試料緩衝液（右側レーン）いずれかでの処理によって調製した。電気泳動の後、溶解した蛋白質をナイロン膜に移し、次いで、抗-OPG抗体でプローブした。OPGの55kdモノマーおよび100kdダイマー形態の相対的位置を矢印の頭によって示す。

図16. CHO細胞で産生された組換えネズミOPGのパルスチェイス分析。CHO細胞を³⁵S-メチオニン/システインでパルス標識し、次いで示された時間、追跡した。代謝的に標識した培養を馴化培地および細胞両者に分離し、各々から界面活性剤抽出物を調製し、清澄化し、次いで、抗-OPG抗体で免疫沈降させた。免疫沈降物をSDS-PAGEによって解像し、フィルムに暴露した。頂部の左側および右側パネル；非還元性条件下で試料を分析した。下方の左側および右側パネ

ル；還元性条件下で試料を分析した。頂部および底部の左側パネル；細胞抽出物。頂部および底部の右側パネル；馴化培地抽出物。OPGの55kdモノマーおよび100kdダイマー形態の相対的移動度は矢印の頭部によって示される。

図17. CTL-2細胞系におけるOPGの発現。CTL-2細胞およびCHO-muOPG [1-401] トランスフェクト細胞からの無血清馴化培地を調製し、濃縮し、次いで非還元性SDS-PAGEおよびウェスタンブロッティングによって分析した。左側レーン；CTL-2馴化培地。右側レーン；CHO-muOPG馴化培地。OPGの55kdモノマーおよび100kdダイマーの相対的移動度は矢印の頭によって示される。

図18. 対照およびOPGトランスジェニックマウスから得られた血清試料および肝臓抽出物におけるOPG発現の検出。トランスジェニックマウスは実施例4に記載したごとくに構築した。OPG発現を、SDS-PAGE、続いて抗-OPG抗体を用いるウェスタンブロッティングによって可視化した。

図19. イン・ビトロにおける骨芽細胞に対するhuOPG [22-401

] -Fc融合蛋白質の効果。示した量のhu

OPG [22-401] -Fc融合の不存在下（対照）または存在下で、破骨細胞形成アッセイを実施例11Aに記載したごとくに行った。破骨細胞形成は酒石酸酸性ホスファターゼ（TRAP）に対する組織化学的染色によって可視化した。A. OPGを100 ng/mlまで添加。D. OPGを0.1 ng/mlまで添加。E. OPGを0.01 ng/mlまで添加。F. OPGを0.001 ng/mlまで添加。G. 対照。OPG無添加。

図20. OPGの量を増大させることに伴う破骨細胞培養TRAP活性の減少。示した濃度のhuOPG [22-401] -Fc融合蛋白質を破骨細胞形成アッセイに添加し、TRAP活性を実施例11Aに記載したごとくに定量した。

図21. 破骨細胞分化の終末段階に対するOPGの効果。huOPG [22-401] -Fc融合蛋白質を、破骨細胞成熟化の間（5-6日；OPG-CTL）または破骨細胞成熟化の終末段階の間（7-15日；CTL-OPG）に破骨細胞形成アッセイに添加した。TRAP活性を定量し、OPGの不存在下全体（OPG-OPG）におけるOPGの存在下（CTL-CTL）で観察された活性と比較した。

図22. マウスにおける血中イオン化カルシウムに対するIL-1 β 、IL-1 α およびOPGの効果。血中イオン化カルシウムのレベルは、IL-1 β 単独、IL-1 α 単独、IL-1 β +muOPG [22-401] -Fc、IL-1 α +MuOPG [22-401] -Fc、およびmuOPG [22-401] -Fc単独の注入後にモニターした。対照マウスにはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）のみを注入した。Aに示されるIL-1 β 実験；Bに示されるIL-1 α 実験。

図23. 対照およびIL-1-処理マウスにおける頭蓋冠破骨細胞に対するOPGの効果。マウス頭蓋冠骨試料を分析する組織学的方法是実施例11Bに記載する。矢印は2日に処理したマウスに存在する破骨細胞を示す。4回のPBS注入を毎日（A）、IL-1の1回注入およびPBSの3回注入を毎日（B）、P

B S の 1 回 注 入 お よ び O P G の 3 回 注 入 を 毎 日 (C) 、 I L - 1 の 1 回 注 入 お よ び O P G の 3 回 注 入 を 毎 日 受 容 す る マ ウ ス の 頭 蓋 冠 試 料。

図 2 4 . 正 常 マ ウ ス の 骨 髄 腔 に お け る 骨 蓄 積 の X - 線 撮 影 分 析 。 マ ウ ス に 生 理 食 塩 水 (A) ま た は 1 4 日 間 の μ O P G [2 2 - 4 0 1] - F c 融 合 (5 m g / k g / d) (B) を 皮

下 注 入 し 、 実 施 例 1 1 C に 記 載 し た ご と く に 骨 密 度 を 測 定 し た。

図 2 5 . 正 常 マ ウ ス の 骨 髄 腔 に お け る 骨 蓄 積 の 組 織 形 態 学 的 分 析 。 注 入 実 験 お よ び 骨 組 織 学 は 実 施 例 1 1 C に お け る ご と く に 行 っ た。

図 2 6 . 正 常 マ ウ ス の 骨 髄 腔 に お け る 骨 蓄 積 の 組 織 学 的 分 析 。 注 入 実 験 お よ び 骨 組 織 学 は 実 施 例 1 1 C に 記 載 し た ご と く に 行 っ た 。 A . 生 理 食 塩 水 。 B . μ O P G [2 2 - 4 0 1] - F c 融 合 の 注 入。

図 2 7 . 卵 巢 摘 出 し た ラ ッ ト に 投 与 さ れ た O P G の 活 性 。 こ の 2 週 間 実 験 に お い て 、 低 下 し た 骨 密 度 に 対 す る 傾 向 は O P G ま た は 他 の 抗 - 吸 収 療 法 に よ っ て ブ ロ ッ ク さ れ た よ う で あ る D E X A 測 定 は 卵 巢 摘 出 時 お よ び 処 置 の 1 週 間 お よ び 2 週 間 に お い て 行 っ た 。 結 果 は 最 初 の 骨 密 度 か ら の % 変 化 と し て 表 す (平 均 値 + / - S E M) 。

図 2 8 . 組 織 形 態 学 的 方 法 に よ っ て 測 定 し た 大 腿 骨 幹 端 に お け る 骨 密 度 は 、 卵 巢 摘 出 の 1 7 日 に お け る 偽 手 術 し た 動 物 (S H A M) よ り も 卵 巢 摘 出 ラ ッ ト (O V X) に お い て よ り 低 い 傾 向 が あ る 。 こ の 効 果 は O P G - F c に よ っ て ブ ロ ッ ク さ れ 、 O P G - F c 処 理 卵 巢 摘 出 ラ ッ ト (O V X + O P G) は ビ ヒ ク ル

処 理 卵 巢 摘 出 ラ ッ ト (O V X) よ り も 有 意 に 高 い 骨 密 度 を 有 す る 。 (平 均 値 + / - S E M)

発明の詳細な記載

腫瘍壊死因子受容体 (T N F R) スーパーファミリーの新規メンバーを、胎児ラット腸 c D N A ライブラリーから単離された発現配列タグ (E S T) と し て 同 定 し た 。 全 長 ラ ッ ト c D N A ク ロ ン お よ び 対 応 す る マ ウ ス お よ び ヒ ト c D N A ク ロ ン の 構 造 は 実 施 例 1 お よ び 6 に 記 載 し た ご と く に 決 定 し た 。 ラ ッ ト 、 マ

ウスおよびヒト遺伝子は、各々、図2B-2C（配列番号：120）、9A-9B（配列番号：122）、および9C-9D（配列番号：124）に示す。全ての3つの配列は、TNFRファミリーメンバーの細胞外ドメインに対して強力な類似性を示した。単離された全長cDNAクローンはいずれも、膜結合受容体につき予測されるであろう膜貫通および細胞質ドメインをコードせず、これはこれらのcDNAは細胞表面受容体よりもむしろ可溶性の分泌蛋白質をコードすることを示唆する。図9Dに示されたヌクレオチド1200-1353にわたるヒト遺伝子の一部は受託番号17188769の下に1995年11月22日にGenebankデータベースに寄託した。

ラットおよびヒトmRNAの組織分布は実施例2に記載したごとくに測定した。ラットにおいて、mRNA発現は腎臓、肝臓、胎盤および心臓で検出され、腎臓で最大の発現であった。骨格筋および脾臓における発現も検出された。ヒトにおいては、発現はリンパ節、胸腺、脾臓および虫垂と共に同組織で検出された。

ラットcDNAは、肝臓-特異的ApoEプロモーター発現系を用いてトランスジェニックマウス（実施例3）で発現された。発現因子の分析は、特に長骨（大腿）、椎骨および偏平骨（骨盤）において、骨密度の顕著な増加を示した。骨の染色した切片の組織学的分析はひどい大理石骨病を示し（実施例4参照）、これは骨形成および吸収の間の顕著な不均衡を示し、骨および軟骨の顕著な蓄積に至った。OPG発現動物の骨における柱状破骨細胞の数の減少は、TNFR-関連蛋白質の活性のかなりの部分が骨吸収（破骨細胞によって媒介されるプロセス）を防止し得ることを示す。トランスジェニック発現因子における活性に鑑みて、ここに記載するTNFR-関連蛋白質をOPGと呼ぶ。

ラットcDNA配列を用い、マウスおよびヒトcDNAクロー

ンを単離した（実施例5）。293細胞におけるマウスOPGおよびイー・コリ（E. coli）におけるヒトOPGの発現は実施例7および8に記載される。マウスOPGはFc融合蛋白質として産生され、これはプロテインAアフィニティークロマトグラフィーによって精製された。また、実施例7に記載するのは

、ヒトIgG1のFc領域に対する融合ポリペプチドとして、あるいは非融合ポリペプチドとしての、CHOおよび293細胞における全長および切形ヒトおよびマウスOPGポリペプチドの発現である。Fc融合ポリペプチドとしてまたは非融合ポリペプチドとしてのイー・コリにおける全長および切形ヒトおよびマウスOPGの発現は実施例8に記載される。組換えにより産生された哺乳動物および細菌OPGの精製は実施例10に記載される。

OPGの生物学的活性はイン・ビトロ破骨細胞成熟アッセイ、インターロイキン-1 (IL-1) 誘導高カルシウム血症のイン・ビボモデル、および正常マウスにおける骨密度の注入実験を用いて測定した (実施例11)。CHOまたは293細胞で産生された以下のOPG組換え蛋白質はイー・コリ破骨細胞成熟アッセイで活性を示した：muOPG [22-185] - F

c、muOPG [22-194] - Fc、muOPG [22-401] - Fc、muOPG [22-401] - Fc、huOPG [22-201] - Fc、huOPG [22-401] - Fc。CHO細胞で産生されたmuOPG [22-180] - Fcおよびイー・コリで産生されたhuOPG met [32-401] はイン・ビトロアッセイで活性を示さなかった。

いくつかの源からのOPGはダイマーとしておよびある程度より多量体として産生された。トランスジェニックマウスで産生されたラットOPG [22-401]、CHO細胞において組換えポリペプチドとして産生されたmuOPG [22-401] およびhuOPG [22-401]、および細胞傷害性T細胞系からの天然に生じる産物として発現されたOPGは、非還元性SDSゲルで分析した場合、圧倒的にダイマーおよびトリマーであった (実施例9参照)。アミノ酸186-401の領域に欠失を有する切形OPGポリペプチド (例えば、OPG [1-185] およびOPG [1-194]) は圧倒的にモノマーであり、これは領域186-401がOPGポリペプチドの自己会合に関与し得ることを示唆する。しかしながら、イー・コリで産生されたhuOPG met [32-401] はかな

りモノマーであった。

OPGは骨吸収の調節で重要であり得る。蛋白質はTNFファミリーの可溶性受容体として作用するようであり、骨溶解性経路に関与する受容体ーリガンド相互作用を妨げ得る。調節の1つの態様は破骨細胞の数の低下のようである。

核酸

本発明は、OPGの生物学的活性のうち少なくとも1つを有するポリペプチドをコードする単離された核酸を提供する。前記したごとく、OPGの生物学的活性は限定されるものではないが骨代謝に関与するいずれの活性も含み、特に骨密度の増大を含む。本発明の核酸は以下のものから選択される。

a) 図2B-2C（配列番号：120）、9A-9B（配列番号：122）、および9C-9D（配列番号：124）に示した核酸配列またはその相補鎖；

b) 図2B-2C（配列番号：120）、9A-9B（配列番号：122）、および9C-9D（配列番号：124）におけるポリペプチドーコーディング領域とストリンジェント条件下でハイブリダイズする核酸；および

c) 包括的に図1Aに示されるヌクレオチド148ないし3

37とストリンジェント条件下でハイブリダイズする核酸、

d) (a) および (b) における配列に対して縮重した核酸配列。

本発明は、ラット、マウスおよびヒトOPGをコードする核酸ならびにOPGの生物学的活性のうちの少なくとも1つを有するポリペプチドをコードするそれにハイブリダイズする核酸配列を提供する。また、図1Aに示されたヌクレオチド148-337を含むラットOPG ESTにハイブリダイズする核酸も提供される。ハイブリダイゼーションについての条件は、一般に、明細書の実施例1に記載された5×SSC、50%ホルムアミドおよび42℃のごとき高ストリンジェンシイである。これらの条件に対する同等のストリンジェンシイは塩および有機溶媒濃度および温度を調整することによって容易に得ることができる。(b)における核酸は、TNF受容体スーパーファミリーの他の公知のメンバーとの検出可能なハイブリダイゼーションを受けない、OPGー関連ポリペプチドをコードする配列を含む。好ましい具体例において、核酸は図2B-2C（配列番号

：120）、9A-9B（配列番号：122）、および9C-9D（配列番号：124）に示されたものである。

本発明のハイブリダイズする核酸の長さは、ハイブリダイゼーションが図2B-2C（配列番号：120）、9A-9B（配列番号：122）、および9C-9D（配列番号：124）に示されたポリペプチドコーディング領域の一部または全部で起こり得、また隣接する非コーディング領域でも起こり得るまで変化し得る。従って、ハイブリダイズする核酸は図2B-2C（配列番号：120）、9A-9B（配列番号：122）、および9C-9D（配列番号：124）に示された配列の切形および伸長形であり得る。切形または延長された核酸は本発明に含まれる。但し、それらはOPGの生物学的特性のうちの1以上を保有するものとする。また、ハイブリダイズする核酸はOPGコーディング領域に対して5'側および／または3'側にある隣接する非コーディング領域を含み得る。非コーディング領域はプロモーター、エンハンサー、翻訳開始部位、転写終止部位等のごときOPG発現に関与する調節領域を含む。

核酸についてのハイブリダイゼーション条件はSambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, C

old Spring Harbor, New York (1989)に記載されている。

ラットOPGをコードするDNAは、ATCC受託番号69970の下で1995年12月27日にAmerican Type Culture Collection, Rockville, MDに寄託したプラスミドpMO-B1.1中にて提供された。マウスOPGをコードするDNAはATCC受託番号69971の下で1995年12月27日にAmerican Type Culture Collection, Rockville, MDに寄託したプラスミドpRcCMV-ネズミOPG中にて提供された。ヒトOPGをコードするDN

AはATCC受託番号69969の下で1995年12月27日にAmerican Type Culture Collection, Rockville, MDに寄託したプラスミドpRcCMV-ヒトOPG中にて提供された。本発明の核酸はストリンジェント条件下でATCC受託番号69969、69970、および69971のDNAインサートにハイブリダイズし、OPGの生物学的活性のうち少なくとも1つを有する。

また、本発明によって、図2B、9Aおよび9Bに示された

核酸配列の誘導体が提供される。ここに記載するごとく、誘導体は、得られた配列が付加され、欠失され、挿入されまたは置換された1以上のアミノ酸を有するポリペプチドをコードし、得られたポリペプチドがOPHの活性を有するように、1以上の残基の付加、置換、挿入または欠失を有する核酸配列を含む。核酸誘導体は、スプライス変化または多形のごとく天然で生じ得る、あるいは当業者に利用できる部位特異的突然変異誘発技術を用いて構築できる。OPGの天然に生じる変異体の1つの例はリーダー配列内の残基3においてlysからasnへの変化をコードする核酸である（実施例5参照）。核酸誘導体は最も生物学的活性を破壊しないらしい分子の領域におけるアミノ酸変化をコードするであろうと予測される。他の誘導体は、膜貫通および細胞質ドメインと共に図2B-2C（配列番号：120）、9A-9B（配列番号：122）、および9C-9D（配列番号：124）に示された細胞外ドメインを有するOPGの膜結合形態をコードする核酸を含む。

1つの具体例において、OPGの誘導体は、カルボキシル末端から1以上のアミノ酸が欠失された切形形態をコードする核酸を含む。OPGをコードする核酸はカルボキシル末端から1

ないし216個のアミノ酸を欠失し得る。所望により、抗体Fc領域を新しいカルボキシル末端から延長させて、生物学的に活性なOPG-Fc融合ポリペプチドを得ることもできる（実施例11参照）。好ましい具体例において、核酸は（図9E-Fにおけるナンバリングを用いて）22-185、22-189、22-

194または22-201からのアミノ酸配列を有するOPGをコードし、所望によりヒトIgGのFc領域をコードする。

また、アミノ末端から1以上のアミノ酸が欠失されたOPGの切形形態をコードする核酸も含まれる。切形形態はリーダー配列よりなる21個のアミノ酸の一部または全部を欠くものを含む。加えて、本発明は、(残基21において)成熟アミノ末端から1ないし10個のアミノ酸が欠失した、および所望により(残基401において)カルボキシル末端から1ないし216個のアミノ酸が欠失したOPGをコードする核酸を提供する。所望により、核酸はアミノ末端におけるメチオニンをコードしてもよい。かかるOPG切形ポリペプチドの例は実施例8に記載される。

本発明の核酸の例はcDNA、ゲノミックDNA、合成DNA

AおよびRNAを含む。cDNAはOPGを発現する種々の組織から単離されたmRNAから調整されたライブラリーから得られる。ヒトにおいては、OPGについての組織源は腎臓、肝臓、胎盤および心臓を含む。OPGをコードするゲノミックDNAは種々の種から商業的に入手可能なゲノムライブラリーから得られる。合成DNAは重複するオリゴヌクレオチド断片を化学合成し、続いて断片を組み立てて、コーディング領域およびフランキング配列の一部または全てを復元することによって得られる(インターフェロン遺伝子の化学合成を記載する米国特許第4,695,623号参照)。RNAは、T7プロモーターおよびRNAポリメラーゼを用いるベクターののような、mRNAの高レベルの合成を支持する原核生物発現ベクターにより、最も容易に得られる。

本発明の核酸配列は、いずれの細胞および組織がOPG mRNAを発現しているかを決定するために、生物学的試料中のOPG配列の検出に使用される。また、該配列はOPGに関連する配列をcDNAおよびゲノムライブラリーからスクリーニングするのにも使用される。かかるスクリーニングは、相同配列を検出するのに適したハイブリダイゼーション条件を用いる当

業者の能力内に十分にある。また、該核酸はアンチセンス療法または遺伝子療法

によってOPGレベルの発現を調節するのに有用である。また、該核酸はポノペプチドの産生および生物学的活性の実験に使用し得るトランスジェニック動物の開発で使用される（実施例3参照）。

ベクターおよび宿主細胞

OPGをコードする核酸配列を含有する発現ベクター、該ベクターで形質転換された宿主細胞およびOPGを生産する方法も本発明によって提供される。組換え蛋白質の発現の総括はMethods of Enzymology v. 185, Goeddel, D. V. 編, Academic Press (1990) に見い出される。

OPGの産生のための宿主細胞はイー・コリのごとき原核生物宿主細胞、酵母、植物、昆虫および哺乳動物宿主細胞を含む。HB101およびJM101のごときイー・コリ株は発現に適している。好ましい哺乳動物宿主細胞はCOS、CHOd-、293、CV-1、3T3、ベイビーハムスター腎臓（BHK）細胞および他のものを含む。哺乳動物宿主細胞は、糖鎖付加およびポリペプチドプロセッシングのごとき翻訳後修飾がOPG

活性で重要である場合に好ましい。哺乳動物発現は増殖培地から回収し得る分泌ポリペプチドの生産を可能とする。

OPGの発現用のベクターは、ベクターの増殖およびクローン化インサートの発現に要する最小の配列を含有する。これらの配列は複製起点、選択マーカー、プロモーター、リボソーム結合部位、エンハンサー配列、RNAスプライス部位および転写終止部位を含む。前記宿主細胞における発現に適したベクターは容易に入手でき、本発明の核酸は標準的な組換えDNA技術を用いてベクターに挿入される。また、OPGの組織-特異的発現用のベクターも含まれる。かかるベクターは、マウスにおける産生のための特に肝臓、腎臓または他の器官で機能するプロモーター、および標的ヒト細胞におけるOPGの発現のためのウイルスベクターを含む。

適当な宿主-ベクター系を用い、OPGが産生される条件下で、OPGをコードする核酸配列を含有する発現ベクターで形質転換した宿主細胞を培養し、次い

で発現の産物を単離することによってOPGを組換え的に産生させる。OPGはトランスフェクトされた哺乳動物細胞の上清または形質転換された細菌宿主細胞の封入体中に産生される。かく産生されたOPGは後

記するごとく当業者に知られた手法によって精製できる。哺乳動物および細菌宿主系におけるOPGの発現は実施例7および8に記載されている。哺乳動物宿主用の発現ベクターはPCT出願90/14363に記載されたpDSR α のごときプラスミドによって例示される。細菌宿主細胞用の発現ベクターは実施例8に記載されたプラスミドpAMG21およびpAMG22-Hisによって例示される。プラスミドpAMG21は、受託番号98113の下に、1996年7月24日にAmerican Type Culture Collection, Rockville, MDに寄託した。プラスミドpAMG22-Hisは、受託番号98112の下に、1996年7月24日にAmerican Type Culture Collection, Rockville, MDに寄託した。記載された特異的プラスミドおよび宿主細胞は説明目的のものであって、他の利用可能なプラスミドおよび宿主細胞もポリペプチドを発現させるのに使用できることが予測される。

また、本発明は、宿主染色体からのOPGの調節を可能とするイン・ビボおよびエクス・ビボ組換え事象による内因性核酸からのOPGの発現を提供する。内因性OPGコーディング領

域からのOPGの産生を指示できる外因性調節配列（例えば、プロモーターまたはエンハンサー）の導入によるOPGの発現も含まれる。（例えば、転写増強因子に暴露することによる）OPG産生を指示できる内因性調節配列の刺激も本発明によって提供される。

ポリペプチド

本発明は、骨代謝に関連した活性を有する、特に骨吸収を阻害し、それにより骨密度を増加させる活性を有する、TNF受容体スーパーファミリーの新規メンバーであるOPGを提供する。OPGとはマウス、ラットまたはヒトOPGのア

ミノ酸配列を有するポリペプチドまたはOPGの生物学的活性のうちの少なくとも1つを有するその誘導体をいう。ラット、マウスおよびヒトOPGのアミノ酸配列は、各々、図2B-2C（配列番号：121）、9A-9B（配列番号：123）、および9C-9D（配列番号125）に示される。OPGの誘導体とは、得られたポリペプチドがOPGの生物学的活性のうちの少なくとも1つを有するように1以上のアミノ酸の付加、欠失、挿入または置換を有するポリペプチドをいう。OPGの生物学的活性は、限定されるものではないが、骨代謝に関与する活性を含

む。好ましくは、該ポリペプチドはアミノ末端リーダー配列の21個のアミノ酸が除去されたものであろう。

本発明によって含まれるOPGポリペプチドはラット[1-401]、ラット[22-180]、ラット[22-401]、ラット[22-401]-Fc融合、ラット[1-180]-Fc融合、マウス[1-401]、マウス[1-180]、マウス[22-401]、ヒト[1-401]、マウス[22-180]、ヒト[22-401]、ヒト[22-180]、ヒト[1-180]、ヒト[22-180]-Fc融合およびヒトmet-32-401を含む。アミノ酸ナンバリングは配列番号：121（ラット）、配列番号：123（マウス）および配列番号：125（ヒト）に示される。また、OPGのアミノ酸残基180-401の一部または全ての欠失またはカルボキシー末端切形；残基180-401の1以上のアミノ酸変化；OPGのシステイン-リッチドメインの一部または全ての欠失、特に末端（カルボキシー末端）システイン-リッチドメインの欠失；およびシステイン-リッチドメイン、特に末端（カルボキシー）システイン-リッチドメインにおける1以上のアミノ酸の変化を有するポリペプチド誘導体も含まれる。1つの具体

例において、OPGはカルボキシ末端から1ないし約216個のアミノ酸が欠失されている。もう1つの具体例において、OPGは成熟アミノ末端（ここに、成熟アミノ末端は残基22におけるものである）から1ないし約10個のアミノ酸

が欠失されており、所望によりカルボキシ末端から1ないし約216個のアミノ酸が欠失されていてもよい。

本発明に含まれるさらなるOPGポリペプチドは以下の：ヒト[22-180]-Fc融合、ヒト[22-201]-Fc融合、ヒト[22-401]-Fc融合、マウス[22-185]-Fc融合、マウス[22-194]-Fc融合を含む。これらのポリペプチドはCHOまたは293細胞のごとき哺乳動物宿主細胞で産生される。原核生物宿主細胞で発現される本発明に含まれるさらなるOPGポリペプチドは以下の：ヒトmet[22-401]、Fc-ヒトmet[22-401]融合(Fc領域は実施例8に記載されるごとく全長OPGコーディング配列のアミノ末端にて融合している)、ヒトmet[22-401]-Fc融合(Fcは全長OPG配列に融合している)、Fc-マウスmet[22-401]融合、マウスmet[22-401]-Fc融合、ヒトmet[27-401]、

ヒトmet[22-185]、ヒトmet[22-189]、ヒトmet[22-194]、ヒトmet[22-194](P25A)、ヒトmet[22-194](P26A)、ヒトmet[27-185]、ヒトmet[27-189]、ヒトmet[27-194]、ヒトmet-arg-gly-ser-(his)₆[22-401]、ヒトmet-lys[22-401]、ヒトmet-(lys)₃-[22-401]、ヒトmet[22-401]-Fc(P25A)、ヒトmet[22-401](P25A)、ヒトmet[22-401](P26A)、ヒトmet[22-401](P26D)、マウスmet[22-401]、マウスmet[27-401]、マウスmet[32-401]、マウスmet[27-180]、マウスmet[22-189]、マウスmet[22-194]、マウスmet[27-189]、マウスmet[27-194]、マウスmet-lys[22-401]、マウスHEK[22-401](A45T)、マウスmet-lys-(his)₇[22-401]、マウスmet-lys[22-401]-(his)₇およびマウスmet[27-401](P33E、G36S、A45P)を含む。原核生物宿主細胞で産生さ

れる前記OPGポリペプチドはアミノ末端メチオニン残基を有する（もし、かかる残基が示されていなければ）。特別の例において、OPG-Fc融合はEllisonら（Nuc. Acids Res. 10, 4071-4079 (1982)）に示された配列を有するヒトIgG1- γ 1の227アミノ酸領域を用いて産生された。しかしながら、ヒトIgGのFc領域の変異体も使用できる。

ヒトIgG1-Fc領域に融合したカルボキシー末端OPG切形の生物学的活性の分析は、活性に必要なOPG部分は約164個のアミノ酸であることを示す。この領域はアミノ酸22-185を含み、好ましくは、OPGとリガンドとの物理的相互作用に影響し得るリガンド結合に重要な残基中のアミノ酸を含む。構造モデルは、増強された生物学的活性、より大きい安定性、または処方により優れた容易性のごとき、より望ましい特性を有するアナログを定めるのを助けることができる。

また、本発明はOPGモノマーからなるOPG多量体も提供する。OPGは多量体（例えば、より大きい数のモノマーのダイマー、トリマー）として活性のようである。好ましくは、OPG多量体はダイマーおよびトリマーである。OPG多量体は

多量体形成を促進するのに十分なOPGのアミノ酸配列を有するモノマーからなり得るか、あるいは抗体Fc領域のごとき異種配列を有するモノマーからなることができる。OPGのカルボキシー末端欠失による分析は、領域186-401の少なくとも一部はOPGポリペプチドの会合に関与していることを示唆している。OPGアミノ酸186-401の領域の一部または全ての、自己会合できるアミノ酸配列での置換も本発明に含まれる。別法として、OPGポリペプチドまたはその誘導体を部位特異的突然変異誘発によってダイマーまたは多量体を形成するように修飾して、紫外線への暴露のごとき光化学架橋によって、あるいは二官能性ポリエチレングリコール等のごとき二官能性リンカー分子での化学的架橋によって、鎖内ジスルフィド結合形成のためのシステイン残基を対をなさないようにすることができる。

OPGポリペプチドの修飾は、本発明に含まれ、翻訳後修飾（例えば、N-結

合またはO-結合炭水化物鎖、N-末端またはC-末端のプロセッシング)、アミノ酸骨格への化学部分の結合、N-結合またはO-結合炭水化物鎖の化学修飾、および原核生物宿主細胞発現の結果としてのN-末端メチオニン残基

の付加を含む。また、ポリペプチドは、蛋白質の検出および単離を可能とするための酵素、蛍光、等方性または親和性標識のごとき検出可能な標識で修飾することもできる。

O P Gのさらなる修飾はキメラ蛋白質を含み、ここにO P Gは異種アミノ酸配列に融合している。異種配列は得られた融合蛋白質がO P Gの活性を保持するようにするいずれの配列であってもよい。異種配列は、例えば、蛋白質の精製を助け得るFc融合のごとき免疫グロブリン融合を含む。O P Gモノマーの会合を促進してダイマー、トリマーおよび他の高次多量体形態を形成させる異種配列が好ましい。

本発明のポリペプチドはO P Gを発現する組織、細胞系および形質転換宿主細胞に存在する他のポリペプチドから単離され精製され、あるいは分泌蛋白質を含む有する細胞培養中の成分から精製される。1つの具体例において、ポリペプチドは、細菌宿主細胞の発現産物のごとく、他のヒト蛋白質を含まない。

また、本発明により、ポリペプチドの安定性および循環時間の増加、または免疫原性の減少のごときさらなる利点を提供し得るO P Gの化学的に修飾された誘導体が提供される(米国特許第4, 179, 337号参照)。誘導体化のための化学部分

はポリエチレングリコール、エチレングリコール/プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール等のごとき水溶性ポリマーから選択できる。ポリマーは分子内のランダムな位置で、または分子内の所定の位置で修飾でき、1、2、3またはそれを超える結合した化学部分を含み得る。

ポリマーはいずれの分子量であってもよく、分岐または非分岐であってよい。ポリエチレングリコールについては、好ましい分子量は、取り扱いおよび製造の

容易性のため、約1 kDa および約100 kDaの間である（「約」なる語はポリエチレングリコールの調製において、いくつかの分子は標準分子量よりも大きく、いくつかはより小さいことを示す）。所望の治療効果プロフィール（例えば、所望の持続放出の継続、もしあれば生物学的活性に対する効果、取り扱いの容易性、免疫原性の程度または欠如、および治療蛋白質またはアナログに対するポリエチレングリコールの他の公知の効果）に依存して他のサイズも使用できる。

ポリエチレングリコール分子（または他の化学部分）は蛋白質の機能的または抗原性ドメインに対する効果を考慮して蛋白

質に結合させるべきである。当業者に利用できる多数の結合方法がある（例えば、引用して本明細書の一部とみなすEP 0401 384（PEGのG-CSFへのカップリング）、またMalikら, Exp. Hematol. 20:1028-1035（1992）（塩化トレシルを用いるGM-CSFのPEG化を報告）。例えば、ポリエチレングリコールは遊離アミノもしくはカルボキシル基のごとき、反応性基を介して、アミノ酸残基を通じて共有結合させることができる。反応性基は活性化されたポリエチレングリコール分子がそれに結合できるものである。遊離アミノ基を有するアミノ酸残基はリシン残基およびN-末端アミノ酸残基を含むことができ；遊離カルボキシル基を有するものはアスパラギン酸残基、グルタミン酸残基およびC-末端アミノ酸残基を含むことができる。また、スルフヒドリル基を、ポリエチレングリコール分子を結合させるための反応性基として用いることもできる。治療目的で好ましいものは、N-末端またはリシン基における結合のごときアミノ基における結合である。

N-末端を化学的に修飾した蛋白質を特別に所望することができる。本組成物の説明としてポリエチレングリコールを用い、

種々のポリエチレングリコール分子（分子量、分岐等による）から、反応ミックス中の蛋白質（またはペプチド）分子に対するポリエチレングリコール分子の割合、行うべきPEG化反応のタイプ、および選択されたN-末端をPEG化した蛋白質を得る方法を選択することができる。N-末端をPEG化した調製物を得

る方法（例えば、要すれば他のモノPEG化した部分からこのPEG化部分を分離すること）は、N-末端をPEG化した物質をPEG化された蛋白質分子から精製することによるものでよい。選択的N-末端化学修飾は還元的アルキル化によって達成でき、これは、特定の蛋白質における誘導体化で利用できる第一級アミノ基（リシン-対-N-末端）の異なるタイプの各様な反応性を付与する。適当な反応条件下で、カルボニル基含有ポリマーでのN-末端における蛋白質の実質的に選択的な誘導体化が達成される。

合成OPGダイマーは種々の化学架橋手法によって調製できる。OPGモノマーはOPGの生物学的活性が保持または増強されるような方法で化学的に連結させることができる。蛋白質ダイマーのいずれの特性が所望されるかに応じて種々の化学架橋剤を用いることができる。例えば、架橋剤は短くて比較的リ

ジトのもしくは長くてよりフレキシダルであってよく、生物学的に可逆的であってよく、低下した免疫原性またはより長い薬物動態学的半減期を供することができるものであってもよい。

1つの例において、OPG分子は2工程合成（実施例12参照）によってアミノ末端を介して連結される。第1の工程において、OPGをアミノ末端にて化学的に修飾して保護されたチオールを導入し、これは、精製後に脱保護され、第2のOPG分子との種々の架橋剤を介する部位-特異的連結のための付着点として用いられる。アミノ末端架橋剤は限定されるものではないが、ジスルフィド結合、短鎖を用いるチオエーテル結合、二官能性脂肪族架橋剤、および種々の長さでのチオエーテル結合、二官能性ポリエチレングリコール架橋剤（PEG「ダンベル」）を含む。また、OPGダイマーのPEGダンベル合成には、「モノベル」と呼ばれるかかる合成の副産物が含まれる。OPGモノベルは遊離ポリマー末端で線状二官能性PEGにカップリングしたモノマーよりなる。別法として、OPGは、ジエチレントリアミンペンタ酢酸二無水物（DTPA）、p-ベンゾキノン（pBQ）またはビト（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS³）ならびに当該分野で公知の他のもののご

とき試薬を含めた種々のアミン特異的ホモ二官能性架橋技術を介して直接架橋させることができる。また、PEGビスマレイミドのごとき種々の二官能性チオール特異的架橋剤でOPGを直接にチオレート化することもでき、また、1工程プロセスでダイマー化および／またはダンベルを達成することもできる。

OPGを天然源からおよびトランスフェクトされた宿主細胞から精製する方法も含まれる。該精製プロセスは精製蛋白質を得るための適当な順の1以上の標準的な蛋白質精製工程を使用できる。クロマトグラフィー工程は、イオン交換、ゲル濾過、疎水性相互作用、逆相、クロマトフォーカシング、抗-OPG抗体またはビオチン-ストレプトアビジン親和性複合体等を使用するアフィニティークロマトグラフィーを含む。

抗体

また、本発明には、OPGに特異的に結合する抗体が含まれる。抗体の創製のための抗原は、全長ポリペプチドまたはOPG配列の一部にわたるペプチドであってよい。OPGと反応性のポリクローナルまたはモノクローナル抗体の創製のための免疫学的手法は当業者に公知である（例えば、HarlowおよびLane, *Antibodies: A Laboratory*

Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N. Y. (1988)）。かく産生された抗体は標準的な酵素結合イムノソルベント検定法を用いて、結合特異性およびエピトープ認識につき特徴付ける。また、抗体は異なる種に由来する可変および定常ドメイン領域を有するキメラ抗体を含む。1つの具体例において、キメラ抗体はネズミ可変ドメインおよびヒト定常ドメインを有するヒト化抗体である。また、ヒトフレームワークにグラフト化された相補性決定領域（いわゆるCDR-グラフト化抗体）も含まれる。キメラおよびCDR-グラフト化抗体は当業者に公知の組換え法によって作成される。また、マウスにおいて作成されたヒト抗体も含まれる。

本発明の抗-OPG抗体はOPGを生物学的試料から精製するためのアフィニティー試薬として使用することができる（実施例10参照）。1つの方法におい

て、抗体をC n B r -活性化S e p h a r o s eに固定化し、抗体-S e p h a r o s eコンジュゲートのカラムを用いて、O P Gを液状試料から取り出す。また、抗体は後記する方法によって生物学的試料中のO

P Gを検出し定量するための診断試薬としても使用される。

医薬組成物

また、本発明は、医薬上許容される希釈剤、担体、可溶化剤、乳化剤、防腐剤および／またはアジュバントと共に治療上有効量の本発明のポリペプチドよりなる医薬組成物を提供する。「治療上有効量」なる語は、特定の疾患および投与経路につき治療効果を供する量を意味する。組成物は液状または凍結乾燥形態ででき、種々のp H値およびイオン強度を有する希釈剤（トリス、酢酸もしくはリン酸緩衝液）、T w e e nまたはP o l y s o r b a t eのごとき可溶化剤、ヒト血清アルブミンまたはゼラチンのごとき担体、チメロサルまたはベンジルアルコールのごとき防腐剤、アスコルビン酸またはメタ重亜硫酸ナトリウムのごとき抗酸化剤を含む。また、溶解性または安定性を増加させるための水溶性ポリマーで修飾したO P Gよりなる組成物も含まれる。また、組成物は、延長された時間にわたって制御された送達のためのリポソーム、マイクロエマルジョン、ミセルまたは小胞へのO P Gの導入よりなることもできる。特に、O P G組成物はヒドロゲル、シリコーン、ポリエチレン、エチレン-酢酸ビニルコポリマー、または生分解性ポリマーのごと

きポリマーマトリックスへの導入を含み得る。ヒドロゲルの例はポリヒドロキシアルキルメタクリレート（p -H E M A）、ポリアクリルアミド、ポリメルタクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールおよび種々のポリ電解質複合体を含む。生分解性ポリマーの例はポリ乳酸（P L A）、ポリグルコン酸（P G A）、P L AおよびP G Aのコポリマー、ポリアミドおよびポリアミドおよびポリエステルのコポリマーを含む。他の制御放出处方は、注入によって投与し得るマイクロカプセル、ミクロスフェア、マクロ分子複合体およびポリマービーズを含む。

特定の組成物の選択は、治療されるべき疾患、投与経路および所望の薬物動態学パラメーターを含めた多数の因子に依存するであろう。医薬組成物に適した成分についてのより広い展望はRemington's Pharmaceutical Science, 第18版, A. R. Gennaro編, Mack, Easton, PA (1980)に見い出される。

本発明の組成物は注射（皮下、静脈内または筋肉内いずれか）、または経口、鼻孔、肺または直腸投与によって投与できる。投与経路は実際には多数の因子に依存して選択され、当業者によ

って確認され得る。

また、本発明は、医薬上許容されるアジュバントと共に治療上有効量の本発明の核酸を含む医薬組成物を提供する。核酸組成物はO P Gコーディング領域の一部または全てをアンチセンスまたは遺伝子治療方法の一部として細胞または組織に送達するのに適するであろう。

治療の方法

骨組織は身体の支持体を供し、ミネラル（大量のカルシウムおよびリン）、コラーゲン性および非コラーゲン性蛋白質のマトリックス、および細胞よりなる。骨で見い出されている3つのタイプの細胞、骨細胞、骨芽細胞および破骨細胞は、それにより骨が継続的に形成され吸収される動的プロセスに関与する。骨芽細胞は骨組織の形成を促進し、他方、破骨細胞は吸収に関連する。吸収、または骨マトリックスおよびミネラルの離解は骨形成と比べて迅速で効率的なプロセスであり、大量のミネラルを骨から放出し得る。破骨細胞は骨格組織の通常の再形成およびホルモンによって誘導される吸収に関与する。例えば、吸収は細胞外流体中のカルシウムイオンの低下した濃度に応答して上皮小体ホルモンの分泌によって刺激される。対照的に、吸

収の阻害はカルシトニンの主たる機能である。加えて、ビタミンDの代謝物は上皮小体およびカルシトニンに対する骨の応答性を改変させる。

骨格成熟の後の、骨格における骨の量は、骨形成および骨吸収の均衡（不均衡

）を反映する。ピークの骨の質量は骨格成熟後であって40代前に起こる。40代および50代の間に、平衡はシフトし、骨吸収が支配的となる。年がゆくに伴う骨質量の不可避的減少は男性よりも女性の方が早く開始し、いくらかの女性（主としてコーカサスおよびアジア系のもの）では閉経後に顕著に加速される。

骨減少症は骨質量が正常レベル未満へのいずれかの減少に一般に関係する疾患である。かかる疾患は骨合成の速度の低下または骨破壊の速度の増加あるいは双方から生じ得る。骨減少症の最も通常の形態は一次骨粗鬆症（閉経後および老人性骨粗鬆症とも呼ばれる）である。骨粗鬆症のこの形態は年齢に伴う骨の普遍的喪失の結果であり、通常は、骨形成は通常速度で、骨吸収が増加した結果である。米国の白人女性の約25ないし30パーセントが症候性骨粗鬆症を発症している。45歳以上の女性において、骨粗鬆症と臀部、大腿、頸部および転子間骨折

との間に直接的関係が存在する。老齢の男性では50および70の間に症候性骨粗鬆症を発症するが、該病気は主として女性に影響を及ぼす。

閉経後のおよび老人性の骨粗鬆症の原因は知られていない。該疾患に寄与し得るいくつかの因子が同定されている。それらは、加齢に伴うホルモンレベルの変化およびカルシウムおよび他のミネラルの腸吸収の低下に帰される不適当なカルシウム消費を含む。治療は、通常、プロセスを遅延させる試みにおけるホルモン療法または規定食補足を含むものであった。しかしながら、現在、骨喪失に対する効果的な治療は存在しない。

本発明は、治療上有効量のOPGを用いて骨障害を治療する方法を提供する。骨障害は正味の骨喪失（骨減少症または骨溶解症）によって特徴付けられるいずれの障害であってもよい。一般に、OPGでの治療は、骨吸収の速度を抑制する必要がある場合に期待される。かくして、治療は吸収速度が正常を超えるあるいは骨吸収が正常レベルよりも低下した場合に骨吸収の速度を低下させるために行って、骨形成の正常レベル未満を補償することができる。

OPGで治療可能な疾患は以下のものを含む：

一次骨粗鬆症、内分泌骨粗鬆症（甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能亢進症、ク

ッシング症候群、および末端肥大症)、遺伝性および先天性形態の骨粗鬆症(骨形成不全症、ホモシスチン尿症、メンケス症候群、およびライリー-デイ症候群)および四肢の固定による骨粗鬆症のごとき骨粗鬆症。

成人および少年少女における骨のパジェット病(変形性骨炎)。

骨髄炎、または骨喪失に至る骨における感染性病巣。

固形腫瘍(乳房、肺および腎臓)に由来する高カルシウム血症および血液学的悪性疾患(多発性骨髄腫、リンパ種および白血病)、特発性高カルシウム血症、および甲状腺機能亢進症および腎臓機能不全に関連する高カルシウム血症。

外科手術後の、ステロイド投与に誘発された、および小腸および大脳の障害に関連した、および慢性肝炎および腎臓病に関連した骨減少症。

外傷性負傷に関連した、またはゴシェ病、鎌状赤血球性貧血、全身性紅斑性狼瘡および他の疾患に関連した非外傷性壊死に関連した、骨壊死、または骨細胞死滅。

慢性関節リウマチによる骨減少。

歯周骨喪失。

骨溶解性転移。

O P Gは骨障害の治療のために単独でまたは他の因子と組み合わせて使用できることは理解される。1つの具体例において、オステオプロテゲリンは骨形成を刺激する治療上有効量の因子と組み合わせて使用される。かかる因子は限定されるものではないがB M P-1ないしB M P-12と呼ばれる骨形態発生因子、トランスフォーミング成長因子- β (T G F- β) およびT G F- β ファミリーのメンバー、インターロイキン-1阻害剤T N F α 阻害剤、上皮小体関連蛋白質およびそのアナログ、E-シリースプロスタグランジン、(アレンドロネートその他のごとき)ビスホスホネート、およびフルオライドおよびカルシウムのごとき骨増強ミネラルを含む。

以下の実施例は本発明を十分説明するために供するが、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。

実施例 1

ラットOPG cDNAの同定および単離

cDNAクローニングおよび分析のための材料および方法はManiatisら, 前掲に記載されている。ポリメラーゼ鎖

反応(PCR)はPCR反応混合物(Boehringer-Mannheim)および製造業者によって特定されたプライマー濃度を用い、Perkin-Elmer 9600サーモサイクラーを用いて行った。一般に、25-50 μ lの反応を94℃で変性し、続いて5秒間の94℃での20-40サイクル、5秒間の50-60℃、および3-5分間の72℃の20-40サイクルを行った。反応を72℃で3-5分間処理した。次いで、反応をManiatisら, 前掲によって記載されているごとくにゲル電気泳動によって分析した。

EST分析のための胚性d20腸から単離したmRNAを用いてcDNAライブラリーを構築した(Adamsら, Science 252, 1651-1656 (1991))。ラット胚を切開し、全発生小腸および大腸を摘出し、PBS中で洗浄した。全細胞RNAを酸性チオシアン酸グアニジニウム-フェノール-クロロホルム抽出によって精製した(ChomczynskiおよびSacchi Anal. Biochem. 162, 156-159 (1987))。製造業者の推奨方法を用い、Dynabeads Oligo (dT) 25 (Dynal Corp)への吸着およびそれからの溶出によって、

全RNA調製物からポリ(A+) mRNA画分を得た。Superscriptプラスミド系(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)を用いてランダム起点cDNAライブラリーを調製した。内部Not I制限部位を含有するランダムcDNAプライマーは以下の配列:

5' - A A A G G A A G G A A A A A A G C G G C C G C T A

C A N N N N N N N T - 3' (配列番号: 1)

Not I

を有していた。

第1鎖合成のために、 $2.5 \mu\text{g}$ のポリ(A)RNAおよび 120 ng 、 360 ng または 1080 ng のランダムプライマーを含有する3つの別々の反応を組み立てた。第2鎖の合成の後、反応精製物をフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1比）の混合物で別々に抽出し、次いで、エタノール沈殿させた。3つの反応の二本鎖(ds) cDNA産物を合し、以下のdsオリゴヌクレオチドアダプターに連結させた。

5' - T C G A C C C A C G C G T C C G - 3' (配列番号：

2)

3' - G G G T G C G C A G G C p - 5' (配列番号：3)

連結後、cDNAをNot Iで完全に消化し、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1）で抽出し、エタノール沈殿させた。次いで、懸濁したcDNAを、製造業者によって推奨されているごとくに、Super scriptプラスミド系(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)を備えた予め作成したカラムを用い、ゲル濾過によりサイズ分画した。最大cDNA生成物を含有する2つの画分をプールし、エタノール沈殿させ、次いで、Not IおよびSal I消化したpMOBベクターDNA(Strathmanら, 1991)に方向付けて連結した。連結したcDNAを、エレクトロポレーションによって、コンピテントElectroMAX DH10Bイー・コリ(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)に導入した。自動配列分析のために、ほぼ10000の形質転換体を、アンピシリン補足LB栄養培地を含有する20 cm×20 cm寒天プレート上に置いた。生起するコロニーを拾い、200 mlのL-ブロス、7.5%グリセロール、および $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含有する96ウェルマイクロタイタープレート上に配置した。

培養を 37°C で一晩増殖させ、マイクロタイタープレートの二連セットを滅菌96ピン複製ツールを用いて作成し、次いで、両セットをさらなる分析のために-

80℃で貯蔵した。全長cDNAクローニングのために、ほぼ100万の形質転換体を、各々約10000クローンを含有する96の細菌アンピシリンプレート上で平板培養した。QiagenプラスミドMaxiキット (Qiagen Corp., ドイツ国) を用いて、各プールからのプラスミドDNAを別々に単離し、PCR分析のために96のマイクロタイタープレートに配置した。

ランダム胎児ラット腸cDNAクローンを配列決定するために、グリセロールストックを解凍し、1:25希釈した小アリコットを蒸留した。ほぼ3.0 μ lの希釈細菌培養を以下のオリゴヌクレオチドを含有するPCR反応混合物 (Boehringer-Mannheim) に添加した。

5' - T G T A A A A C G A C G G C C A G T - 3' (配列
番号 : 4)

5' - C A G G A A A C A G C T A T G A C C - 3' (配列
番号 : 5)

反応を以下のサイクル条件 : 2分間の94℃ ; 5秒間の94℃、

5秒間の50℃、および3分間の72℃の30サイクル ; 4分間の72℃でサーモサイクラー (Perkin-Elmer 9600) 中でインキュベートした。サーモサイクラーにおけるインキュベーションの後、反応を2.0mLの水で希釈した。増幅したDNA断片を、製造業者の推奨法を用い、Centriconカラム (Princeton Separations) を用いてさらに精製した。製造業者の推奨法に従い、T3プライマー (オリゴヌクレオチド353-23 ; 5' - C A A T T A A C C C T C A C T A A A G G - 3') (配列番号 : 6) 、Taq色素ターミネーター反応 (Applied Biosystems) を用い、PCR反応生成物をApplied Biosystems 373A自動DNA配列決定器で配列決定した。

ランダムに拾ったcDNAクローンから得られた5'ヌクレオチド配列を翻訳し、次いで、FASTAプログラム (Pearsonら, Meth. Enzymol. 183, (1990)) の修飾バージョンを用いて、公知の蛋白質配列の存

在するデータベースと比較した。また、L u e t h y ら (P r o t e i n S c i e n c e 3, 139-146 (1994)) によって

修飾された G r i b s k o v ら (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 83, 4355-4359 (1987)) の配列プロファイル法を用い、翻訳された配列を、腫瘍壊死因子受容体 (T N F R) スーパーファミリー (S m i t h ら C e l l 76, 959-962 (1994)) の全ての公知のメンバーにおける特異的システイン-リッチの蛋白質モチーフの存在につき分析した。

F A S T A およびプロファイルサーチデータを用い、E S T、F R I - 1 (F e t a l ラットインテスチン-1) を T N F R スーパーファミリーの可能な新しいメンバーとして同定した。F R I - 1 はほぼ 600 b p インサートを含有し、L O R F は約 150 アミノ酸であった。データベースにおける最も近いマッチはヒト II 型 T N F R (T N F R - 2) であった。比較した領域はこの 150 a a L O R F にわたって T N F R - 2 および F R I - 1 の間に ~ 43 % の相同性を示した。T N F R スーパーファミリーの第 1 および第 3 システイン-リッチの反復を用いるプロファイル分析により ~ 8 の Z スコアが得られ、これは F R I - 1 遺伝子が恐らくは新しいファミリーメンバーをコードすることを示す。F R I - 1 生成物の構造を推定するため

に、胎児ラット周 c D N A ライブラリーを全長クローンにつきスクリーニングした。以下のオリゴヌクレオチドが元の F R I - 1 から誘導された。

5' - G C A T T A T G A C C C A G A A A C C G G A C -

3' (配列番号: 7)

5' - A G G T A G C G C C C T T C C T C A C A T T C -

3' (配列番号: 8)

これらのプライマーを P C R 反応で用いてプラスミド D N A の 96 プール (各プールは 10000 の独立した c D N A クローンからのプラスミド D N A を含有) をスクリーニングした。以下のサイクル条件: 94 °C における 2 分、1 サイク

ル；94℃における15秒、次いで65℃における45秒、30サイクル；65℃における7分、1サイクルでPerkin-Elmer 96ウェルのサーマルサイクラーを用い、ほぼ1 μ gのプラスミドプールDNAをPCR反応混合物（Boehringer-Mannheim）中で増幅した。PCR反応生成物をゲル電気泳動によって分析した。96プラスミドDNAプールのうち13が予期された相対的分子量を持つ増幅DNA生成物を生起した。

一つの陽性プールからのDNAを用いて、前記したごとくにコンピテントElectroMAX DH10Bイー・コリ（Gibco BRL, Gaithersburg, MD）を形質転換した。ほぼ40000の形質転換体を滅菌ニトロセルロースフィルター（BA-85、SchleicherおよびShuell）上に平板培養し、次いで、前記で得られたPCR産物の³²P-dCTP標識バージョンを用い、コロニーハイブリダイゼーションによってスクリーニングした。フィルターを5×SSC、50%脱イオン化ホルムアミド、5×デンハート溶液、0.5%SDS、および100 μ g/ml変性サケ精子DNA中、42℃で2-4時間プレハイブリダイズさせた。次いで、フィルターを5×SSC、50%脱イオン化ホルムアミド、2×デンハート溶液、0.1%SDS、100 μ g/ml変性サケ精子DNA、および~5 ng/mlの標識プローブ中、42℃で~18時間ハイブリダイズさせた。次いで、フィルターを室温にて2×SSC中で10分間、55℃にて1×SSC中で10分間、および最後に55℃にて0.5×SSC中で10-15分間洗浄した。オートラジオグラフィーに続いてハイブリダイズするクローンを検出し、次いで、二次スクリーニン

グのためにニトロセルロースフィルター上に再平板培養した。二次スクリーニングに際して、プラスミドクローン（pB1.1）を単離し、次いで、100 μ g/mlアンピシリンを含有するL-ブロス培地中で増幅させ、プラスミドDNAが得られた。2.4 kb pB1.1インサートの両鎖を配列決定した。

pB1.1インサート配列を公のデータベースのFASTAサーチを用いて、いずれかの存在する配列とのマッチおよび／または類似性を検出した。いずれの

公知の遺伝子またはESTに対してもマッチは見い出されなかったが、ヒトおよびマウスTNFR-2遺伝子に対してほぼ45%の類似性があった。メチオニン開始コドンはヌクレオチド配列のbp124に見い出され、続いてbp1327で終了する401aa残基をコードするLORFがあった。該401aa残基産物は、そのN-末端におけるほぼ31残基の疎水性シグナルペプチドおよびN-結合糖鎖付加の4つの可能な部位を有すると予測される。疎水性の膜を貫通する配列は、PepPlotプログラム(Wisconsin GCG package, version 8.1)を用いては同定されなかった。次いで、推定された401aaを用いて蛋白質データベースをサーチした。再度、存在するマ

ッチはなかったが、TNFRスーパーファミリーの多くのメンバー、最も顕著にはヒトおよびマウスTNFR-2に対する強力な類似性があるようであった。TNFRスーパーファミリーの公知のメンバーとこの新規な蛋白質の配列並置をPileupプログラムを用いて調製し、次いで、Prettyplot(Wisconsin GCG package, version 8.1)によって修飾した。この並置は全長FRI-1遺伝子産物と全ての他のTNFRファミリーメンバーとの間の明瞭な相同性を示した。相同領域はTNFRファミリーメンバーの細胞外ドメインにマップされ、これらの蛋白質のリガンド結合ドメインで見い出される3つまたは4つのシステイン-リッチの反復に対応する。これは、FRI-1遺伝子が新規なTNFRファミリーメンバーをコードすることを示唆した。膜貫通領域が検出されなかったので、本発明者らはこれはTNFR-1由来可溶性受容体(Kohnら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 8331-8335 (1990))と同様に、分泌受容体であり得ると予測した。FRI-1遺伝子の明らかな生物学的活性のため、該産物をオステオプロテゲリン(OPG)と命名した。

実施例2

組織におけるOPG mRNA発現パターン

複数のヒト組織ノーザンブロット(Clonetech)を³²P-dCTP標

識FRI-1 PCR産物でプローブして、ヒト転写体のサイズを検出し、および発現のパターンを決定した。ノーザンブロットを、 $5\times$ SSPE、50%ホルムアミド、 $5\times$ デンハート溶液、0.5%SDS、および $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNA中、 42°C で2-4時間プレハイブリダイズさせた。次いで、該ブロットを、 $5\times$ SSPE、50%ホルムアミド、 $2\times$ デンハート溶液、0.1%SDS、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ 変性サケ精子DNA、および $5\text{ng}/\text{ml}$ 標識プローブ中、 42°C で18-24時間ハイブリダイズさせた。次いで、ブロットを室温にて $2\times$ SSC中で10分間、 50°C にて $1\times$ SSC中で10分間、次いで $0.5\times$ 中で10-15分間洗浄した。

ラット遺伝子から誘導されたプローブを用い、約2.4kbの相対的分子量を持つ支配的mRNA種を、腎臓、肝臓、胎盤および心臓を含めたいくつかの組織中で検出する。最高のレベルは腎臓で検出される。Mr 4.5および7.5kbの大きな

mRNA種を骨格筋および脾臓で検出した。ヒト胎児組織においては、腎臓は比較的高いレベルの2.4kb mRNAを発現することが判明した。ヒトプローブ（後記参照）を用い、これら同じ組織で2.4kb転写体のみが検出される。加えて、比較的高レベルの2.4kb転写体がリンパ節、胸腺、脾臓および虫垂で検出された。ラットおよびヒトの両オステオプロテグリン遺伝子によって検出された転写体のサイズはラットpB1.1 FRI-1インサートの長さとはほとんど同一であり、これは、それが全長cDNAクローンであることを示唆する。

実施例 3

トランスジェニックマウスにおけるOPGの全身送達

ラットOPGクローンpB1.1を鋳型として用いて、ApoE-肝臓特異的発現ベクター（Simonetら, J. Clon. Invest. 94, 1310-1319 (1994)、およびPCT出願US94/11675および共有米国特許出願第08/221,767号）にサブクローニングするためにコーディング領域をPCR増幅した。各々、以下の5'および3'オリゴヌクレオチドをPCR増幅で用いた。

5' - G A C T A G T C C C A C A A T G A A C A A G T G
G C T G T G - 3' (配列番号: 9)

5' - A T A A G A A T G C G G C C G C T A A A C T A T
G A A A C A G C C C A G T G A C C A T T C - 3' (配列番号: 10)

PCR反応混合物 (Boehringer-Mannheim) を以下のごとくに処理した: 1分間の94℃、1サイクル; 20秒間の94℃、30秒間の62℃、および1分間の74℃、25サイクル。増幅に続き、試料をQiagen PCRカラムで精製し、SpeIおよびNotI制限酵素で一晩消化した。消化した生成物を抽出し、沈殿させ、ApoEプロモーター発現ベクターにサブクローンした。得られたクローンHE-OPGをマイクロインジェクションに付すに先立って、それを配列決定してそれが突然変異がないことを確認した。

HE-OPGプラスミドを2ラウンドのCsCl密度勾配遠心によって精製した。精製したプラスミドDNAをXhoIおよびAseIで消化し、3.6 kb トランスジーンインサートをゲル電気泳動によって精製した。精製した断片を5 mM トリス、pH 7.4、0.2 mM EDTA 中 1 μg/ml のストック注射溶液まで希釈した。BDF1×BDF1交雑マウスか

らの単一細胞胚を、注射針に傾角を付け、使用前にシリコン処理を施した以外は実質的に記載されているごとくに (Brinsterら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 4338 (1985)) 注射した。胚をCO₂インキュベーター中で一晩培養し、15ないし20の2-細胞胚を偽妊娠CD1雌マウスの卵管に移した。

妊娠期間に続き、マイクロインジェクション処理した胚の着床から49の子供が得られた。該子供をゲノミックDNA試料中の一体化されたトランスジーンのPCR増幅によってスクリーニングした。増幅の標的領域は、発現ベクターに含まれたヒトApoEイントロンの369 bp 領域であった。PCR増幅で使用したオリゴは以下のものであった。

5' - G C C T C T A G A A A G A G C T G G G

A C - 3' (配列番号: 11)

5' - C G C C G T G T T C C A T T T A T G A

G C - 3' (配列番号: 12)

PCRについての条件は: 2分間の94℃、1サイクル; 1分間の94℃、20秒間の63℃、および30秒間の72℃、30サイクルであった。49の元の子供のうち、9がPCR陽

性トランスジェニック創始体として同定された。

8-10週齢において、5つのトランスジェニック創始体(2、11、16、17および28)および5つの対照(1、12、15、18および30)を剖検および病理学的分析のために犠牲にした。肝臓を部分的肝切除によって残りの4の創始体から摘出した。部分的肝切除では、マウスを麻酔し、肝臓の葉を外科的に摘出した。記載されているごとくに(McDonaldら, Meth. Enzymol. 152, 219 (1987))、全てのトランスジェニック創始体、および5の陰性対照同腹子供肝臓から全細胞RNAを単離した。ノーザンブロット分析をこれらの試料で行ってトランスジェン発現のレベルを評価した。各動物肝臓からの全RNAのほぼ10μgを、電気泳動変性ゲル(Ogdenら, Meth. Enzymol. 152, 61 (1987))によって解像し、次いで、HYBOND-Nマイロン膜(Amersham)に移し、³²P dCTP-標識pB1.1インサートDNAでプローブした。50%ホルムアミド、5×SSPE、0.5%SDS、5×デンハート溶液、100μg/ml変性サケ精子DNAおよび2-4×10⁶cpmの標識プローブ/mlのハイブリダイゼーシ

ョン緩衝液中、42℃でハイブリダイゼーションを一晩行った。ハイブリダイゼーションに続き、プロットを、各々2×SSC、0.1%SDS中、室温にて2回、次いで、各々0.1×SSC、0.1%SDS中、55℃にて5-10分間2回洗浄した。創始体および対照同腹子供におけるトランスジェンの発現をオー

ラジオグラフィーにより測定した。

ノーザンブロットデータは、トランスジェニック創始体のうち7つが検出可能なレベルのトランスジェンmRNAを発現することを示す（動物番号2、11、16、17、22、33および45）。陰性対照マウスおよび創始体のうち1つ（番号28）はトランスジェン関連mRNAを発現しなかった。OPGは分泌蛋白質であると予測されるので、トランスジェンmRNAの過剰発現は、全身送達された遺伝子産物のレベルの現れであるはずである。PCRおよびノーザンブロット陽性マウスのうち、動物2、17および22は最高レベルのトランスジェンmRNAを発現し、宿主細胞および組織に対する広範な生物学的効果を示し得る。

実施例4

OPGの生物学的活性

以下の手法に従い、5匹のトランスジェニックマウス（動物2、11、16、17および28）および5匹の対照同腹子供（動物1、12、15、18および30）を剖検および病理学的分析のために犠牲にした。安楽死に先立って、全ての動物はその同定番号を確認し、次いで、体重を測定し、麻酔し、血液を採取した。完全な血清化学および血液学パネルのために血液は血清および全血として保存した。目視切開に先立ち、致死的CO₂吸入による最終安楽死の直後にX線撮影を行った。これに続き、組織を摘出し、組織学的調査のために10%緩衝化Zn-ホルマリン中で固定化した。収集した組織は肝臓、脾臓、膵臓、胃、十二指腸、回腸、結腸、腎臓、生殖器官、皮膚および乳腺、骨、脳、心臓、肺、胸腺、気管、食道、甲状腺、空腸、盲腸、直腸、副腎、膀胱、および骨格筋を含むものであった。固定に先立ち、全器官の重量を肝臓、胃、腎臓、副腎、脾臓および胸腺につき測定した。固定の後、組織をパラフィンブロックに加工し、3μmの切片を得た。ギ酸溶液を用いて骨組織を脱灰し、全ての切片をヘマトキシリンおよびエオシンで染色し

た。加えて、ゴモリのレチクリンおよびマッソンのトリクロムでの染色をある組

織に対して行った。酵素組織学法を行って、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP)、破骨細胞 (単球-マクロファージ系統の多核骨-再吸収細胞) によって高度に発現される酵素の発現を測定した。また、BrdUおよびF480単球-マクロファージ表面抗原についての免疫組織化学法を行って、各々、複製する細胞および単球-マクロファージ系統の細胞を検出した。F480表面抗原発現を検出するために、ホルマリン固定し、パラフィン包埋した4 μ m切片を脱パラフィン化し、脱イオン水に水和させた。切片を3%過酸化水素でクエンチし、Protein Black (Lipshaw, Pittsburgh, PA) でブロックし、ラットモノクローナル抗-マウスF480 (Harlan, Indianapolis, IN) 中でインキュベートした。クロマトゲンとしてDABを用い (BioTek, Santa Barbara, CA) を用い、ビオチン化ウサギ抗-ラット免疫グロブリン、ペルオキシダーゼコンジュゲートドストレプトアビジン (BioGenex San Ramon, CA) によってこの抗体を検出した。切片をヘマトキシリンで逆染色した。

目視切開および内臓組織の観察により、トランスジェン発現体または対照同腹子供で異常性は見いだされなかった。器官重量の分析は、脾臓のサイズが、対照と比較してトランスジェニックマウスでほぼ38%増加していることを示す。トランスジェン発現体で血小板サイズのわずかな拡大および循環非染色細胞の増加があった。トランスジェン発現体で血小板レベルでほんのわずかな減少があった。加えて、血清尿酸、尿窒素、およびアルカリ性ホスファターゼレベルは全てトランスジェン発現体で低い傾向であった。発現体は長骨 (大腿)、椎骨、および偏平骨 (骨盤) を含めた骨格の放射能密度の増加を有することが判明した。発現体における大腿の相対的サイズは対照マウスと異ならなかった。

OPG発現体からの骨の染色切片の組織学的分析は、ひどい大理石骨病を示し、一次海綿からの軟骨残骸が大腿の骨幹における柱状骨内で観察された。明瞭に規定される皮質は大腿の切片では同定できなかった。正常な動物では、中心骨幹には骨髓が充填されている。また、椎骨の切片は大理石骨病変化を示し、これはOPG-誘導骨格変化が全身的であることを意味する。残りの骨髓は圧倒的に骨

髓様要素を示した。巨核球は存在した。

レチクリン染色はレチクリン沈積の証拠を示さなかった。F 4 8 0（マウスにおける単球-マクロファージ起源の細胞によって発現される細胞表面抗原）の免疫組織化学法は骨髓腔においてF 4 8 0 陽性細胞の存在を示した。局部的に、平坦なF 4 8 0 陽性細胞が柱状骨表面に直接隣接して観察できた。

柱状骨をライニングする間葉細胞は扁平で、不活性のようであった。H & E およびT R A P 染色に基づき、破骨細胞はO P G 発現体における柱状骨表面では稀にしか見いだされなかった。対照的に、破骨細胞および／または軟骨吸収細胞が軟骨を吸収する成長プレートの領域で観察されたが、それらの数は対照と比較して少ないであろう。また、破骨細胞は、再形成活性が通常豊富な骨幹端の皮質表面で存在した。発現体および対照との間の圧倒的な差異は、椎骨および大腿双方における、柱状破骨細胞のかかなりの減少であった。骨蓄積の程度は全肝臓R N A のノーザンブロッティングによって検出されたO P G トランスジーンm R N A のレベルに直接関連した。

O P G 発現体からの脾臓は増大した量の赤脾髄を有し、造血の増大のため膨張していた。全ての造血系統は現れていた。F 4 8 0 陽性細胞は、赤脾髄において、対照およびO P G 発現体

双方で存在した。発現体のうちの2つ（2および17）は肝臓内に髓外造血の病巣を有しており、これは大理石病骨のためのようである。

胸腺、リンパ節、胃腸管、脾臓-肝胆管、呼吸器管、生殖系、性器-泌尿器系、皮膚、神経系、心臓および大動脈、乳房、骨格筋および脂肪で観察できる異常はなかった。

実施例 5

マウスおよびヒトO P G c D N A の単離

マウスO P G m R N A の5' 末端に対応するc D N A クローンをP C R 増幅によってマウス腎臓c D N A ライブラリー（C l o n e t e c h）から単離した。オリゴヌクレオチドはラットO P G c D N A 配列から誘導され、それは以下

に示される。

5' - A T C A A A G G C A G G G C A T A C T T C C T G -

3' (配列番号: 13)

5' - G T T G C A C T C C T G T T T C A C G G T C T G -

3' (配列番号: 14)

5' - C A A G A C A C C T T G A A G G G C C T G A T G -

3' (配列番号: 15)

5' - T A A C T T T T A C A G A A G A G C A T C A G C -

3' (配列番号: 16)

5' - A G C G C G G C C G C A T G A A C A A G T G G C T

G T G C T G C G - 3' (配列番号: 17)

5' - A G C T C T A G A G A A A C A G C C C A G T G A C

C A T T C C - 3' (配列番号: 18)

このプロセスで得られた部分的および全長 cDNA 産物を配列決定した。全長産物を Not I および Xba I で消化し、プラスミドベクター pRcCMV (Invitrogen) に方向付けてクローン化した。得られたプラスミドを pRcCMV-Mu-OPG と命名した。クローン化産物のヌクレオチド配列をラット OPG cDNA 配列と比較した。OPG LORF にわたる 1300bp 領域にわたって、ラットおよびマウス DNA 配列はほぼ 88% 同一である。マウス cDNA 配列は 401aa LORF を含有し、これをラット OPG 蛋白質配列と比較し、gaps を除いて ~94% 同一であることが判明した。これは、単離されたマウス cDNA 配列はネズミ OPG 蛋白質をコードすること、および配列および構造は進化を通じて高度に保存されていることを示す。マウス OPG 蛋白質配列は同一

の推定シグナルペプチドをそのN-末端に含有し、N-結合糖鎖付加の全ての4つの可能な部位が保存されている。

部分的ヒトOPG cDNAを、以下のラット-特異的オリゴヌクレオチドを用いてヒト腎臓cDNAライブラリーからクローン化した。

5' - G T G A A G C T G T G C A A G A A C C
T G A T G - 3' (配列番号: 19)

5' - A T C A A A G G C A G G G C A T A C T
T C C T G - 3' (配列番号: 20)

このPCR産物を配列決定し、これを用いて、鋳型としてラムダにおけるヒトOPGゲノミッククローンを用い、ヒトcDNAの3'末端を増幅するためのプライマーを設計した。

5' - T C C G T A A G A A A C A G C C C A G T G A C C -
3' (配列番号: 29)

5' - C A G A T C C T G A A G C T G C T C A G T T T G -
3' (配列番号: 21)

増幅されたPCR産物を配列決定し、5'末端配列と一緒に用いて、全ヒトOPG cDNAコーディング配列を増幅するのに有用な5'および3'ヒト-特異的プライマーを設計した。

5' - A G C G C G G C C G C G G G G A C C A C A A T G A
A C A A G T T G - 3' (配列番号: 22)

5' - A G C T C T A G A A T T G T G A G G A A A C A G C
T C A A T G G C - 3' (配列番号: 23)

全長ヒトPCR産物を配列決定し、次いで、Not IおよびXba Iを用いて、プラスミドベクターpRcCMV (Invitrogen) に方向付けてクロ

ーン化した。得られたプラスミドを p R c C M V - ヒ ト O P G と命名した。クローン化産物のヌクレオチド配列をラットおよびマウス O P G c D N A 配列と比較した。O P G L O R F にわたる 1 3 0 0 b p にわたって、ラットおよびマウス D N A 配列はヒト O P G c D N A と 7 8 - 8 8 % 同一であった。また、ヒト O P G c D N A 配列は 4 0 1 a a L O R F を含有し、それをラットおよびマウス蛋白質配列と比較した。予測されたヒト O P G 蛋白質は、各々、ラットおよびマウス蛋白質とほぼ 8 5 % 同一、～ 9 0 % 同一である。ラット、マウスおよびヒト蛋白質の配列を並べると、それらは進化の間に高度に保存されていたことを示す。ヒト蛋白質は N - 末端シグナルペプチド、および N - 結合糖鎖付加の 5 つの可能な部位を有することが予測され、そのうち 4 つはラット

およびマウス O P G 蛋白質の間で保存されている。

マウス O P G の D N A および予測されるアミノ酸配列を図 9 A および 9 B に示す（配列番号：1 2 2）。ヒト O P G の D N A および予測されるアミノ酸配列を図 9 C および 9 D に示す（配列番号：1 2 4）。ラット、マウスおよびヒト O P G アミノ酸の比較を図 9 E および 9 F に示す。

さらなるヒト O P G c D N A クローンの単離により、図 9 C に示した D N A 配列の 1 0 3 位における G から C への塩基変化の存在を明らかにした。このヌクレオチド変化の結果、図 9 C に示したアミノ酸配列の 3 位のリシンの代わりにアスパラギンでの置換となる。この変化を有するクローンにおける配列の残りは図 9 C および 9 D のものと同一である。

実施例 6

O P G 三次元構造モデリング

O P G のアミノ末端部分は T N F R スーパーファミリーの全ての公知のメンバーの細胞外部分と相同性を有する（図 1 C）。T N F R - 関連遺伝子のこの領域における最も顕著なモチーフは～ 4 0 アミノ酸、システインーリッチな反復配列であり、これは別の構造へと折り畳まれている（B a n n e r ら, C e l

1 7 3, 4 3 1 - 4 4 5 (1 9 9 3)) 。このモチーフは通常 4 つの（範囲 3

ー6) タンデム反復 (図1C参照) で表示され、リガンド結合に関与することが知られている (Beutlerおよびvan Huf fel Science 264, 667-663 (1994))。各反復は通常は6つの間隔を設けたシステイン残基を含有し、これは3つのドメイン内ジスルフィド結合 (SS1、SS2およびSS3と呼ばれる) の形成に関与している (Banner, 前掲)。TNFR2、CD30およびCD40のごときいくつかの受容体において、反復ドメインのうちのいくつかは2つの鎖内ジスルフィド結合のみを含有する (SS1およびSS3)。

Luetthyら (前掲) によって記載されている方法を用いて、ヒトOPG蛋白質配列をTNFR1細胞外ドメインプロファイルに対して並べ、Wisconsin Package, version 8.1 (Genetics Computer Group, Madison, WI) からのPrettyPlotプログラムを用いて結果をグラフ表示した (図10)。配置はドメイン1-4の形成に関与するシステイン残基の明瞭な保存を示す。次いで、この配置を用いて、鑄型として p55 T

NFR1 (Bannerら, 前掲) の細胞外ドメインの公知の3-D構造を用い、ヒトOPG N-末端ドメインの三次元 (3-D) モデルを構築した。これをなすために、ペプチド骨格および同一残基の側鎖の原子座標をTNFR1の結晶構造座標からコピーした。これに続き、挿入および異なる側鎖についての残りの座標を、LOOKプログラム (Molecular Applications Group, Palo Alto, CA) を用いて創製した。次いで、LOOKを用いてそのコンフォメーションエネルギーを最小化することによって3-Dモデルを良質化した。

他のTNFRファミリーメンバーとの類似性から、OPGはリガンドと結合すると思われる。OPGとそのリガンドとの相互作用をモデル化する目的で、TNF- β の結晶構造を用いて「OPGリガンド」の3-D表示をシミュレートした。Molscript (Kraulis, J. Appl. Cryst., 24, 946-950, 1991) を用い、このデータをグラフ表示した (図11参照

)。3つのTNF β および3つのOPG分子でのOPG／リガンド複合体についてのモデルを構築し、ここに、OPGの相対的位置は結晶構造におけるT

NFR1と同一である。次いで、このモデルを用いて、以下のアプローチを用い、そのリガンドと相互作用し得るOPGの残基を見つけた。複合体における全ての残基および1つの単一OPGモデルの溶媒接近可能な領域を計算した。モノマーにおけるのと異なる複合体での接近性を有する残基はリガンドと相互作用するようである。

この情報を用い、ヒトおよびマウスOPGアミノ酸配列を再度並べて、システムリッチのドメイン1-4の各々よりなる配列を強調した（図12Aおよび12B参照）。各ドメインは予測できる個々の構造特徴を有する。

ドメイン1

SS2（C41ないしC54）およびSS3（C44ないしC62）ジスルフィド結合に関与する4つのシステインを含有する。SS1結合はジスルフィド架橋に基づいて明らかではないが、28位で観察されたチロシンはTNFR1におけるY20と相同であり、これはドメイン形成を助けるためにH66と相互作用するのに関与することが知られている。OPGは75位に相同ヒスチジンを有し、これはOPG Y28およびH75が、TNFR1における相同残基がそうであるように、天然

蛋白質において一緒に重なることを示唆する。従って、これらの残基の双方は、事実、生物学的活性で重要であり得、Y28までおよびそれを越えてのN-末端OPG切形は活性を改変し得る。加えて、残基E34およびK43は、本発明者らの3次元モデルに基づく結合リガンドと相互作用することが予測される。

ドメイン2

6つのシステインを含有し、SS1（C65ないしC80）、SS2（C83ないしC98）およびSS3（C87ないしC105）ジスルフィド結合を含有することが予測される。また、OPGのこの領域は、TNF β との密接な接触を形成（前記参照）するTNFR1ドメイン2の一部に対応するP66-Q91か

ら伸びる領域を含み、OPGリガンドと相互作用し得る。特に、残基P66、H68、Y69、Y70、T71、D72、S73、H75、T76、S77、D78、E79、L81、Y82、P85、V86、K88、E89、L90、およびQ91は本発明者の構造データに基づく結合リガンドと相互作用することが予測される。

ドメイン3

SS1 (C107ないしC118) およびSS3 (C124ないしC142) ジスルフィド結合に関与する4つのシステインを含有する。本発明者の構造データに基づく、残基E115、L118およびK119はOPGリガンドと相互作用することが予測される。

ドメイン4

SS1 (C145ないしC160) およびSS3 (C166ないしC185) ジスルフィド結合に関与する4つのシステインを含有するが、ドメイン3と同様にSS2結合は含有しない。本発明者らの構造データはE153およびS155はOPGリガンドと相互作用すると予測する。

かくして、OPGについての予測される構造モデルは、その生物学的活性に重要であるらしい高度に保存された多数の残基を同定する。

実施例7

哺乳動物細胞における組換え分泌OPG蛋白質の産生

OPGが現実分泌蛋白質であるかどうかを判断するために、マウスOPG cDNAをタグとしてヒトIgG1 Fcド

メインに融合させ (Caponら, Nature 337, 525-531 (1989))、ヒト293繊維芽細胞で発現させた。Fc融合はベクターpFc-A3を用いて行った。pFc-A3は、ヒンジドメインの最初のアミノ酸 (Glu-99) からカルボキシル末端までのヒト免疫グロブリンIgG- γ 1重鎖 (Ellisonら, 前掲) のFc部分をコードする領域を含有し、5'-NotI融合部位および3'-SalIおよびXbaI部位が隣接する。プラスミドは

ヒト脾臓 cDNA ライブラリー (Clontech) の PCR 増幅によって構築した。PCR 反応は 100 μ l の最終容量で行い、400 μ M の各 dTNP および 1 μ M の各プライマーと共に増幅されるべき 1 ng の cDNA ライブラリーを含む、20 mM トリス-HCl (pH 8.8)、10 mM KCl、10 μ M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2 mM MgSO_4 、0.1% トリトン X-100 中で、Vent DNA ポリメラーゼ (New England Biolabs) の 2 ユニットを使用した。反応は 2 分間の 95 $^{\circ}\text{C}$ における変性によって開始し、続いて 30 秒間の 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 秒間の 55 $^{\circ}\text{C}$ 、および 2 分間の 73 $^{\circ}\text{C}$ の 30 サイクルを行った。5' プライマー：

5' ATAGCGGCGCTGAGCCCAAACTCTTG
TGACAAAACCTCAC3' (配列番号：24)

は、IgG- γ 1 のヒンジドメインの最初の残基 (Glu-99) の直ぐ 5' 側の Not I 部位に導入した。3' プライマー：

5' -TCTAGAGTCGACTTATCATTTACCC
GGAGACAGGGAGAGGCTCTT-3' (配列番号：
25)

は、Sal I および Xba I 部位に導入した。717-bp PCR 産物を Not I および Sal I で消化し、1% アガロース (FMC Corp.) を通す電気泳動によって単離し、GeneClean 手法 (Bio 101, Inc.) によって精製し、Not I、Sal I-消化 pBluescript II KS ベクター (Stratagene) にクローン化した。得られたプラスミド pFc-A3 中のインサートを配列決定して PCR 反応の信頼性を確認した。

プラスミド pRcCMV-MuOPG におけるクローン化マウス cDNA を、以下の 2 セットのプライマー対を用いて増幅した。

対 1

5' - CCTCTGAGCTCAAGCTTCCGAGGAC

CACAAATGAACAAG - 3' (配列番号: 26)

5' - CCTCTGCGGCCGCTAAGCAGCTTAT

TTTCAACGGATTGAACCTG - 3' (配列番号: 2

7)

対2

5' - CCTCTGAGCTCAAGCTTCCGAGGAC

CACAAATGAACAAG - 3' (配列番号: 28)

5' - CCTCTGCGGCCGCTGTTGCATTTCCT

TTTCTG - 3' (配列番号: 30)

第1の対は全OPG LORFを増幅し、Fc融合ベクターpFcA3中の枠内NotI部位に適合するNotI制限部位を生じる。pFcA3はヒトIgG1 FccDNAのアスパラギン酸残基216の5'側にNotI制限部位を作成することによって調製した。この構築体はOPG蛋白質およびIgGFc領域の間の結合にわたる2つの重要でないアミノ酸をコードするリンカーを導入する。この産物は、Fc部分に連結されると、全ての401OPG残基、すぐに続いてのヒトIgG1

Fc領域(F1, Fc)の全ての227アミノ酸残基をコードする。第2のプライマー対は、その推定リガンド結合ドメインを含む、OPGの最初の180アミノ酸残基をコードするDNA配列を増幅する。前記したごとく、3'プライマーは、トレオニン180位におけるC-末端切形OPG LORFを直接IgG1 Fcドメイン(CT, fc)に融合させる人工的なNotI制限部位を生じる。

OPG残基401およびヒトFc領域のアスパラギン酸残基221を連結するアミノ酸配列結合は以下のごとくに修飾できる。ヒトFc領域の残基216-2

20をコードするDNAを後記するごとくに欠失させることができるか、あるいはヒトFc領域のC220に対応するシステイン残基をセリンまたはアラニンいずれかに突然変異させることができる。これらの修飾ベクターによってコードされたOPF-Fc融合蛋白質はヒト293細胞、またはCHO細胞にトランスフェクトでき、組換えOPG-Fc融合蛋白質を後記するごとく精製できる。

両産物をプラスミドベクターpCEP4 (Invitrogen) に方向付けてクローン化した。pCEP4はエプスタン-バーウイルスの複製起点を含有し、それは293-EBN

A-1細胞においてエピソーム複製できる。製造業者の推奨法を用い、親pCEP4、およびpCEP4-F1.FcおよびpCEP4-CT.Fcベクターを293-EBNA-1細胞にリポフェクトした。次いで、トランスフェクトした細胞を100 μ g/mlヒグロマイシン中で選択して、ベクターにつき選択し、得られた薬剤耐性集団培養を密集するまで増殖させた。次いで、細胞を無血清培地中で72時間培養し、馴化培地を取り出し、SDS-PAGEによって分析した。ポリアクリルアミドゲルの銀染色は、薬剤耐性203培養によって産生された主要馴化培地蛋白質を検出する。pCEP4-F1.FcおよびpCEP4-CT.Fc馴化培地において、予測される唯一のバンドが豊富に分泌された(図13Bおよび13C参照)。全長Fc融合蛋白質は高濃度まで蓄積し、これはそれが安定であることを示す。両Fc蛋白質はウェスタンブロット上で抗ヒトIgG Fc抗体(Pierce)によって検出され、これはそれらが組換えOPG産物であることを示す。

製造業者の推奨法を用い、全長OPG-Fc融合蛋白質をプロテイン-Aカラムクロマトグラフィー(Pierce)によって精製した。次いで、Matusdairaら(J. Bio

1. Chem. 262, 10-35 (1987))によって実質的に記載されているごとくに、自動エドマン分解によって、蛋白質をN-末端配列分析に付した。以下のアミノ酸配列が19サイクル後に読まれた。

N H 2 - E T L P P K Y L H Y D P E T G H Q L L - C O 2

H (配列番号: 31)

この配列はアミノ酸残基22で始まる予測されるマウスOPGアミノ酸配列と同一であり、このことは天然哺乳動物リーダー切断部位が元々予測されたアミノ酸残基Y31-D32の間ではなくQ21-E22の間にあることを示唆する。pCEP4-FcおよびpCEP4-CTFcにて293-EBNA細胞で行った発現実験は、OPGが分泌蛋白質であり、そのリガンドに結合するように全身的に作用し得ることを示している。

muOPG [22-180]-FcおよびmuOPG [22-401]-Fc融合を構築し発現させるのに用いたのと同様の手法をさらなるマウスおよびヒトOPG-Fc融合蛋白質で使用した。

ヒトIgG1のFc領域に融合したアミノ酸1-185 [m

uOPG C t (185)・Fc] をコードするネズミOPG cDNAを以下のごとくに構築した。プラスミドpRcCMVMuオステオプロテゲリンからのネズミOPG cDNA (実施例5に記載) を、後記するごとくポリメラーゼ鎖反応において以下のプライマー対を用いて増幅した。

1333-82:

5' - T C C C T T G C C C T G A C C A C T

C T T - 3' (配列番号: 32)

1333-80:

5' - C C T C T G C G G C C G C A C A C A

C G T T G T C A T G T G T T G C - 3' (配列番号: 33)

このプライマー対は、図9Aに示すごとく、OPGリーディングフレームのアミノ酸残基63-185 (bp 278-645に対応) をコードするネズミOP

G_cDNA領域を増幅する。3'プライマーはFc融合ベクターpFcA3の枠内NotI部位に適合するNotI制限部位を含有する。また、産物はbp436に位置する唯一のEcoRI制限部位に及ぶ。増幅されたPCR産物を精製し、NotIおよびEcoRIで切

断し、得られたEcoRI-NotI制限断片を精製した。ネズミ1-401OPG-Fc融合インサートを有するベクターpCEP4をEcoRIおよびNotIで切断し、精製し、前記で生じたPCR産物に連結した。得られたpCEP4-ベースの発現ベクターはOPGH残基1-185、直ぐに続いているヒトIgG1-Fc領域の全ての227アミノ酸残基をコードする。ネズミOPG 1-185-Fc融合ベクターを293細胞にトランスフェクトし、薬剤選択し、馴化培地を前記したごとくに生産した。得られた分泌ネズミOPG 1-185-Fc融合産物を、製造業者の推奨法を用い、プロテイン-Aカラムクロマトグラフィー(Pierce)によって精製した。

ヒトIgG1のFc領域に融合したアミノ酸残基1-194(muOPG C t (194). Fc)をコードするネズミOPG DNAを以下のごとくに構築した。プラスミドpRcCMV Mu-オステオプロテゲリンからのネズミOPG_cDNAを、以下のプライマー対を用いて増幅した。

1338-82:

5' - T C C C T T G C C C T G A C C A C T

C T T - 3' (配列番号: 34)

1333-81:

5' - C C T C T G C G G C C G C C T T T T

G C G T G G C T T C T C T G T T - 3' (配列番号: 35)

このプライマー対はOPGリーディングフレームのアミノ酸残基70-194(bp298-672に対応)をコードするネズミOPG_cDNAを増幅する

。3'プライマーはFc融合ベクターpFcA3の枠内NotI部位に適合するNotI制限部位を含有する。また、生成物はbp436に位置する唯一のEcoRI制限部位に及ぶ。増幅されたPCR産物を前記したごとくにネズミOPG [1-401] Fc融合ベクターにクローン化した。得られたpCEP4-ベースの発現ベクターはOPG残基1-194、直ぐに続いてのヒトIgG1 Fc領域の全ての227アミノ酸残基をコードする。ネズミOPG1-194 Fc融合ベクターを293にトランスフェクトし、薬剤選択し、馴化培地を生産した。得られた分泌融合産物を、製造業者の推奨法を用い、プロテイン-Aカラムクロマトグラフィー (Pierce) によって精製した。

ヒトIgG1のFc領域に融合したアミノ酸1-401をコ

ードするヒトOPG DNAは以下のごとくに構築した。プラスミドpRcCMV-V-huオステオプロテゲリンにおけるヒトOPG DNA (実施例5に記載) を以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅した。

1254-90:

5' - C C T C T G A G C T C A A G C T T G
G T T T C C G G G G A C C A C A A T G - 3'

(配列番号: 36)

1254-95:

5' - C C T C T G C G G C C G C T A A G C
A G C T T A T T T T T A C T G A A T G G -

3' (配列番号: 37)

得られたPCR産物は、全長ヒトOPG蛋白質をコードし、Fc融合ベクターFcA3の枠内NotI部位に適合するNotI制限部位を生じる。該PCR産物を前記したごとくにプラスミドベクターpCEP4に方向付けてクローン化する。得られた発現ベクターはヒトOPG残基1-401、直ぐに続けてのヒトIgG1 Fc領域の227アミノ酸残基をコードする。馴化培地をトランスフェ

クトし薬剤選択した細胞から生産し、

製造業者に推奨法を用い、プロテイン-Aカラムクロマトグラフィー (P i e r c e) によって h u O P G F 1 . F c 融合産物を精製した。

ヒト I g G 1 の F c 領域に融合したアミノ酸残基 1-201 をコードするヒト O P G DNA [h u O P G C t (201) . F c] は以下のごとくに構築した。プラスミド p R r C M V - h u オステオプロテゲリンからのクローン化ヒト O P G c DNA を、以下のオリゴヌクレオチドプライマー対を用いて増幅した。

1254-90:

5' - C C T C T G A G C T C A A G C T T G
G T T T C C G G G G A C C A C A A T G - 3'

(配列番号: 38)

1254-92:

5' - C C T C T G C G G C C G C C A G G G
T A A C A T C T A T T C C A C - 3' (配列番号:

39)

このプライマー対は O P G リーディングフレームのアミノ酸残基 1-201 をコードするヒト O P G c DNA 領域を増幅

し、F c 融合ベクター F c A 3 の枠内 N o t I 部位に適合する 3' 末端における N o t I 制限部位を生じる。この産物は、F c 部に連結すると、O P G 残基 1-201、直ぐに続いてのヒト I g G 1 F c 領域の全ての 221 アミノ酸残基をコードする。P C R 産物を前記したごとくにプラスミドベクター p C E P 4 に方向付けてクローン化した。トランスフェクトし、薬剤選択した細胞から馴化培地を生産し、製造業者の推奨法を用い、h u O P G C t (201) . F c 融合産物をプロテイン-Aカラムクロマトグラフィー (P i e r c e) によって精製した。

以下の手法を用いて、未融合マウスおよびヒトOPGを構築し発現させた。

pRcCMV Mu-オステオプロテゲリンからのネズミOPG cDNAのPCR増幅によって、全長ネズミOPG（残基1-401）の哺乳動物発現用のプラスミドを調製し、発現ベクターpDSR α （DeClerkら, J. Biol. Chem. 266, 3893（1991））にサブクローンした。以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

1295-26:

5' - C C G A A G C T T C C A C C A T G A
A C A A G T G G C T G T G C T G C - 3'（配列
番号：40）

1295-27:

5' - C C T C T G T C G A C T A T T A T A
A G C A G C T T A T T T T C A C G G A T T
G - 3'（配列番号：41）

ネズミOPG全長リーディングフレームを前記したごとくにPCRによって増幅した。PCR産物を精製し、製造業者の推奨する条件下で、制限エンドヌクレアーゼHindIIIおよびXbaI（Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN）で消化し、次いで、HindIIIおよびXbaI消化のpDSR α に連結した。組換えクローンを制限エンドヌクレアーゼ消化によって検出し、次いで、配列決定してPCR増幅工程の間に突然変異が生じなかったことを確認した。

得られたプラスミドpDSR α -muOPGをカルシウム媒介トランスフェクション（Wiglerら, Cell 11, 233（1977））によってチャイニーズハムスター卵巣（C

HO）細胞に導入した。個々のコロニーを、プラスミドベクター中のジヒドロ葉

酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子の発現に基づいて選択し、いくつかのクローンを単離した。ネズミOPG組換え蛋白質の発現をCHO細胞馴化培地のウェスタンブロット分析によってモニターした。高発現細胞を選択し、OPG発現を記載されているごとくに (DeCleaarkら, 前掲) メトトレキセートでの処理によってさらに増幅した。CHO細胞系からの馴化培地を、組換え分泌ネズミOPG蛋白質のさらなる精製のために生産した。

全長ヒトOPG (アミノ酸1-401) の哺乳動物発現用のプラスミドは、pRcCMV-huオステオプロテゲリン中のcDNAを直接ベクターpDSR α (DeCleaarkら, 前掲) にサブクローンすることによって得た。pRcCMV-OPGプラスミドをNotIで完全に消化し、クレノウで平滑末端とし、次いで、XbaIで完全に消化した。ベクターDNAをHindIIIで消化し、クレノウで平滑末端とし、次いで、XbaIで消化し、次いで、OPGインサートに連結した。次いで、組換えプラスミドを配列決定して、ヒトOPG cDNAの適切な向きを確認した。

得られたプラスミドpDSR α -huOPGを前記したごとくにチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞に導入した。プラスミドベクター中のジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) の発現に基づいて個々のコロニーを選択し、いくつかのクローンを単離した。CHO細胞馴化培地のウェスタンブロット分析によって、ヒトOPG組換え蛋白質の発現をモニターした。高発現クローンを選択し、メトトレキセートでの処理によってOPG発現をさらに増幅した。蛋白質精製のために、ヒトOPGを発現するCHO細胞系から馴化培地を生産した。

残基1-185をコードするネズミOPG用の発現ベクターは以下のごとくに構築した。pRcCMV-Mu OPGからのネズミOPG cDNAを、以下のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅した。

1333-82:

5' - T C C C T T G C C C T G A C C A C T

C T T - 3' (配列番号: 42)

1356-12:

5' - C C T C T G T C G A C T T A A C A C
 A C G T T G T C A T G T G T T G C - 3' (配列

番号: 43)

このプライマー対は、OPGリーディングフレーム (bp 278-645) のアミノ酸63-185をコードするネズミOPG cDNA領域を増幅し、システインコドン (C185) の直後の人工的停止コドンを含むし、続いて人工的Sal I制限エンドヌクレアーゼ部位がある。予測される産物は予め存在するベクターにサブクローンするのに有用な内部EcoR I制限部位を含む。PCR増幅後、得られた精製産物をEcoR IおよびSal I制限エンドヌクレアーゼで切断し、大きな断片をゲル精製した。次いで、精製された産物を、前記したpBluescript-muOPG F1. FcのEcoR IおよびSal I消化物の大きな制限断片にサブクローンした。得られたプラスミドをHind I I IおよびXho Iで消化し、小さい断片をゲル精製した。残基1-185をコードするオープンリーディングフレームを含むこの断片を次いで発現ベクターpCEP4のHind I I IおよびXho I消化物にサブクローンした。得られたベクターpmuOPG (1-185) は185位に位置するシステイン残基で終わる切形OPGポリペプチドをコードする。トランスフェクトし、薬剤選択した細胞からの馴化培地を前記したごとくに生産した。

1333-82:

5' - T C C C T T G C C C T G A C C A C T
 C T T - 3' (配列番号: 44)

1356-13:

5' - C C T C T G T C G A C T T A C T T T
 T G C G T G G C T T C T C T G T T - 3' (配列
 番号 : 45)

このプライマー対はOPGリーディングフレーム (bp 298-672) をコードするネズミOPG cDNA領域を増幅し、リシンコドン (K194) の直後の人工的停止コドンを含むし、これに続いて人工的にSalI制限エンドヌクレアーゼ部位がある。予測される産物は予め存在するベクターへサブクローンするのに有用な内部EcoRI制限部位を含む。PCR増幅後、得られた精製産物をEcoRIおよびSalI制限エンドヌクレアーゼで切断し、大きな断片をゲル精製した。次いで、精製産物を前記したpBluescript-muOPG.F1.FcのEcoRIおよびSalI消化物の大きな制限断片にサブクローンした。得られたプラスミドをHindI

IIおよびXhoIで消化し、小さな断片をゲル精製した。残基1-185をコードするオープンリーディングフレームを含むこの断片を次いで発現ベクターpCEP4のHindIIIおよびXhoI消化物にサブクローンした。得られたベクターpmuOPG[1-185]は194位におけるリシンで終わる切形OPGポリペプチドをコードする。トランスフェクトし、薬剤選択した細胞からの馴化培地を前記したごとくに生産した。

残基22ないし32の間のOPGのアミノ酸置換または欠失を導入するいくつかの突然変異をhuOPH[22-401]-Fc遺伝子の5'末端に生じさせた。全ての突然変異は、製造業者の推奨する条件を用い、「QuickChangeTM部位特異的突然変異誘発キット」(Stratagene, San Diego, CA)で生じさせた。略言すれば、huOPG[22-401]-FcプラスミドDNA鋳型および突然変異原性プライマーを含む反応ミックスをデオキシヌクレオチドの存在下でPfuポリメラーゼで処理し、次いで、前記したごとくにサーモサイクラーで増幅した。次いで、反応のアリコットを、熱ショックによってコンピテント・イー・コリ

X L 1 - B l u e にトランスフェクトし、次いで平板培養した。トランスフェクタントからのプラスミドDNAを配列決定して突然変異を確認した。

以下のプライマー対を用いて、ヒトOPG遺伝子の残基22-26を欠失し、h u O P G [2 7 - 4 0 1] - F c 融合蛋白質が産生された。

1 4 3 6 - 1 1 :

5' - T G G A C C A C C C A G A A G T A C
C T T C A T T A T G A C - 3' (配列番号: 1 4 0)

1 4 3 6 - 1 2 :

5' - G T C A T A A T G A A G G T A C T T
C T G G G T G G T C C A - 3' (配列番号: 1 4 1)

以下のプライマー対を用いてヒトOPG遺伝子の残基22-28を欠失し、その結果、h u O P G [2 9 - 4 0 1] - F c 融合蛋白質が産生された。

1 4 3 6 - 1 7 :

5' - G G A C C A C C C A G C T T C A T T
A T G A C G A A G A A A C - 3' (配列番号: 1 4
2)

1 4 3 6 - 1 8 :

5' - G T T T C T T C G T C A T A A T G A
A G C T G G G T G G T C C - 3' (配列番号: 1 4
3)

以下のプライマー対を用いて、ヒトOPG遺伝子の残基22-31を欠失させ、その結果、h u O P G [3 2 - 4 0 1] - F c 融合蛋白質が産生された。

1 4 3 6 - 2 7 :

5' - G T G G A C C A C C C A G G A C G A
A G A A A C C T C T C - 3' (配列番号: 144)

1436-28:

5' - G A G A G G T T T C T T C G T C C T
G G G T G G T C C A C - 3' (配列番号: 145)

以下のプライマー対を用いて、ヒトOPG遺伝子のコドンを変化させてチロシン残基28をフェニルアラニンに変えた。その結果、h u O P G [22-401] - F c Y 2 8 F 融合蛋白質が産生された。

1436-29:

5' - C G T T T C C T C C A A A G T T C C
T T C A T T A T G A C - 3' (配列番号: 146)

1436-30:

5' - G T C A T A A T G A A G G A A C T T
T G G A G G A A A C G - 3' (配列番号: 147)

以下のプライマー対を用いて、ヒトOPG遺伝子のコドンを変えて、プロリン残基26をアラニンコドンに変化させた。その結果、h u O P G [22-401] - F c P 2 6 A 融合蛋白質が産生された。

1429-83:

5' - G G A A A C G T T T C C T G C A A A
G T A C C T T C A T T A T G - 3' (配列番号: 1
48)

1429-84:

5' - C A T A A T G A A G G T A C T T T G
 C A G G A A A C G T T T C C - 3' (配列番号: 1
 49)

次いで、適当な突然変異を含有する各得られたmuOPG [22-401] -
 Fc プラスミドをヒト293細胞にトランスフェクトし、前記したごとく突然変
 異体OPG-Fc融合蛋白質

を馴化培地から精製した。各蛋白質の生物学的活性を実施例11に記載したイン
 ・ビトロ破骨細胞形成アッセイで評価した。

実施例 8

イー・コリにおけるOPGの発現

A. 細菌発現ベクター

pAMG21

発現プラスミドpAMG21は、米国特許第4,710,473号に記載され
 たAmgen発現ベクターから誘導されるAmgen発現ベクターpCFM16
 56 (ATCC番号69576) から誘導できる。pCFM1656プラスミド
 は、記述されているpCFM836プラスミド (米国特許第4,710,473
 号) から次のように誘導できる: (a) T4ポリメラーゼ酵素で末端を満たし、
 続いて平滑末端連結することによって2つの内因性NdeI制限部位を破壊し、
 次いで、(b) 合成PLプロモーターを含有する唯一のAatIIおよびCla
 I制限部位の間のDNA配列を、PLプロモーターを含有するpCFM636 (米
 国特許第4,710,473号) から得られた同様の断片で置き換え、

AatII
 5' CTAATTCGGCTCTCACCTACCAAACAATGCCCCCTGCAAAAAATAAATTCATAT-
 3' TGCAGATTAAGGCGAGAGTGGATGGTTTGTACGGGGGACGTTTTTTATTTAAGTATA-

 -AAAAAACATACAGATAACCATCTGCGGTGATAAATTATCTCTGGCGGTGTTGACATAAA-
 -TTTTTGTATGICTATTGGTAGACGCCACTATTTAATAGAGACCGCCACAACCTGTATTT-

 -TACCACTGGCGGTGATACTGAGCACAT 3' (配列番号：53)
 -ATGGTGACCGCCACTATGACTCGTGTAGC5' (配列番号：54)
 ClaI

次いで、(c) 唯一の ClaI および KpnI 制限部位の間の小さな配列を以下のオリゴヌクレオチド：

5' CGATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTAC3'
 (配列番号：48)
 3' TAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGC 5'
 (配列番号：49)
 ClaI KpnI

で置き換える。

次いで、発現プラスミド pAMG21 は、PCR 重複オリゴ突然変異誘発および DNA 配列置換によって、一連の部位特異的塩基変化を作成することにより pCFM1656 から誘導できる。プラスミド複製プロモーター PcopB の直ぐ 5' 側の BglII 部位 (プラスミド bp # 180) で出発し、プラスミド複製遺伝子に向けて進行し、塩基対変化は以下の通りである。

<u>pAMG21 bp #</u>	<u>pCFM1656 における bp</u>	<u>pAMG21 における以下のものへの bp 変化</u>
# 204	T/A	C/G
# 428	A/T	G/C
# 509	G/C	A/T
# 617	- -	2 の G/C bp 挿入
# 679	G/C	T/A
# 980	T/A	C/G
# 994	G/C	A/T
# 1004	A/T	C/G
# 1007	C/G	T/A
# 1028	A/T	T/A
# 1047	C/G	T/A
# 1178	G/C	T/A
# 1466	G/C	T/A
# 2028	G/C	bp 欠失
# 2187	C/G	T/A
# 2480	A/T	T/A
# 2499-2502	AGTG TCAC	GTCA CAGT
# 2642	TCCGAGC AGGCTCG	7bp 欠失
# 3435	G/C	A/T
# 3446	G/C	A/T
# 3643	A/T	T/A

唯一の AatII (pCFM1656 中位置#4364) および SacII (pCFM1656 中位置#4585) 制限部位の間の DNA 配列を以下の DNA 配列で置き換える。

```

[AatII 粘着末端]          5'      GCGTAACGTATGCATGGTCTCC-
(pAMG21 における位置#4358) 3' TGCACGCATTGCATACGTACCAGAGG-

-CCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACT-
-GGTACGCTCTCATCCCTTGACGGTCCGTAGTTTATTTTGCTTTCCGAGTCAGCTTTCTGA-

-GGGCCTTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGC-
-CCCGGAAAGCAAAATAGACAACAAACAGCCACTTGCGAGAGGACTCATCCTGTTTAGGCG-

-CGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCCGC-
-GCCCTCGCCTAAACTTGCAACGCTTCGTTGCCGGGCCTCCACCGCCGTCCTGCGGGCG-

-CATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGT-
-GTATTTGACGGTCCGTAGTTTAAATTCGTCTTCCGGTAGGACTGCCTACCGGAAAAACGCA-

                                AatII
-TTCTACAAACTCTTTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGGACGTCGTACTTAAC-
-AAGATGTTTGAGAAAACAAATAAAAAGATTTATGTAAGTTTATACCTGCAGCATGAATTG-

-TTTTAAAGTATGGGCAATCAATTGCTCCTGTTAAAATTGCTTTAGAAATACTTTGGCAGC-
-AAAATTTCATACCCGTTAGTTAACGAGGACAATTTTAACGAAATCTTTATGAAACCGTCG-

```

```

-GGTTTGTGTATTGAGTTTCATTTGCGCATTGGTTAAATGGAAAGTGACCGTGCGCTTAC-
-CCAAACAACATAACTCAAAGTAAACGCGTAACCAATTTACCTTTCCTGCGACGCGAATG-
-TACAGCCTAATATTTTTGAAATATCCCAAGAGCTTTTTCTTCGCGATGCCACGCTAAAC-
-ATGTCGGATTATAAAAACTTTATAGGGTCTCGAAAAAGGAAGCGTACGGGTGCGATTTG-

-ATTCTTTTTCTCTTTTGGTTAAATCGTTGTTTGATTATTATTTGCTATATTTATTTTTTC-
-TAAGAAAAAGAGAAAACCAATTTAGCAACAACTAAATAATAAACGATATAAATAAAAAAG-

-GATAATTATCAACTAGAGAAGGAACAATTAATGGTATGTTCATACACGCATGTAAAAATA-
-CTATTAATAGTTGATCTCTTCCTTGTTAATTACCATACAAGTATGTGCGTACATTTTTAT-

-AACTATCTATATAGTTGTCTTTCTCTGAATGTGCAAACTAAGCATTCCGAAGCCATTAT-
-TTGATAGATATATCAACAGAAAGAGACTTACACGTTTTGATTGCGTAAGGCTTCGGTAATA-

-TAGCAGTATGAATAGGGAACTAAACCCAGTGATAAGACCTGATGATTTGCTTCTTTAA-
-ATCGTCATACTTATCCCTTTGATTTGGGTCACTATTCTGGACTACTAAAGCGAAGAAATT-

-TTACATTTGGAGATTTTTTATTTACAGCATTGTTTTCAAATATATTCCAATTAATCGGTG-
-AATGTAAACCTCTAAAAAATAAATGTCGTAAACAAAAGTTTATATAAGGTTAATTAGCCAC-

-AATGATTGGAGTTAGAATAATCTACTATAGGATCATATTTTATTAAATTAGCGTCATCAT-
-TTACTAACCTCAATCTTATTAGATGATATCCTAGTATAAAATAATTTAATCGCAGTAGTA-

-AATATTGCCTCCATTTTTTAGGGTAATTATCCAGAATTGAAATATCAGATTTAACCATAG-
-TTATAACGGAGGTAAAAAATCCCATTAATAGGTCTTAACCTTATAGTCTAAATTGGTATC-

-AATGAGGATAAATGATCGCGAGTAAATAATATTCACAATGTACCATTTTAGTCATATCAG-
-TTACTCCTATTTACTAGCGCTCATTATTATAAGTGTTACATGGTAAATCAGTATAGTC-

-ATAAGCATTGATTAATATCATTATTGCTTCTACAGGCTTTAATTTTATTAATTATTCTGT-
-TATTGCTAACTAATTATAGTAATAACGAAGATGTCCGAAATTAAATAATTAATAAGACA-

-AAGTGTGCTCGGCATTTATGTCTTTCATACCCATCTCTTTATCCTTACCTATTGTTTGTC-
-TTCACAGCAGCCGTAAATACAGAAAGTATGGGTAGAGAAATAGGAATGGATAACAAACAG-

-GCAAGTTTTGCGTGTTATATATCATTAAAAACGGTAATAGATTGACATTTGATTCTAATAA-
-CGTTCAAAACGCACAATATATAGTAATTTTGCCATTATCTAACTGTAAACTAAGATTATT-

-ATTGGATTTTTGTGACACTATTATATCGCTTGAAATACAATTGTTTAACATAAGTACCTG-
-TAACCTAAAAACAGTGTGATAATATAGCGAATTTATGTTAACAAATTGTATTTCATGGAC-

-TAGGATCGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGGTTTGTATAGTCGATTAATCGATTTGATT-
-ATCCTAGCATGTCCAAATGCGTTCTTTTACCAAAACAATATCAGCTAATTAGCTAAACTAA-

-CTAGATTTGTTTTAACTAATTAAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTGGA-
-GATCTAAACAAAATTGATTAATTTCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGCT-

                                     SacII
-GCTCACTAGTGTGACCTGCAGGGTACCATGGAAGCTTACTCGAGGATCCGCGGAAAGAA-
-CGAGTGATCACAGCTGGACGTCCCATGGTACCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCCTTTCTT-

-GAAGAAGAAGAAGAAAGCCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATA-
-CTTCTTCTTCTTCTTTTCGGGCTTTCTTCGACTCAACCGACGACGGTGGCGACTCGTTAT-

-ACTAGCATAACCCCTTGGGGCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTGTGTAAGGAGG-
-TGATCGTATTGGGGAACCCCGGAGATTTGCCAGAACTCCCCAAAAACGACTTTCTCC-

-AACCGCTCTTCACGCTCTTCACGC 3' [SacII 粘着末端] (配列番号：50)
-TTGGCGAGAAGTGCGAGAAGTG 5' (pAMG21 における位置#590) (配列番号：46)

```

この置換DNA配列の粘着末端の連結の間に、A t a I IおよびS a c I I部位の外部は破壊される。置換DNAには唯一のA a t I IおよびS a c I I部位

がある。

pAMG22-His

発現プラスミド pAMG22-His は、pAMF22 の唯一の NdeI (#4795) および EcoRI (#4818) 制限部位の間の小さな DNA 配列を以下のオリゴヌクレオチドデュプレックスで置き換えることによって、Amgen 発現ベクター pAMG22 から誘導できる。

```

      NdeI                               NheI                               EcoRI
5'  TATGAAACATCATCACCATCACCATCATGCTAGCGTTAACGCGTTGG      3'
   (配列番号: 51)

3'  ACTTTGTAGTAGTGGTAGTGGTAGTACGATCGCAATTGCGCAACCTTAA  5'
   (配列番号: 52)

      MetLysHisHisHisHisHisHisHisAlaSerValAsnAlaLeuGlu
   (配列番号: 168)

```

pAMG22

発現プラスミド pAMG22 は、1987 年 12 月 1 日に許可された米国特許第 4,710,473 号に記載された Amgen 発現ベクター系から誘導される Amgen 発現ベクター pCFM1656 (ATCC#69576) から誘導できる。p

CFM1656 プラスミドは、記述されている pCFM836 (特許番号第 4,710,473 号) から次のように誘導できる: (a) T4 ポリメラーゼ酵素で末端を満たし、続いて平滑末端連結することによって 2 つの内因性 NdeI 制限部位を破壊し、次いで、(b) 合成 PL プロモーターを含有する唯一の AatII および ClaI 制限部位の間の DNA 配列を、PL プロモーターを含有する pCFM636 (米国特許第 4,710,473 号) から得られた同様の断片で置き換え、

AatII

5' CTAATTCGCTCTCACCTACCAAACAATGCCCCCTGCAAAAAATAAATTCATAT-
 3' TGCAGATTAAGGCGAGAGTGGATGGTTTGTACGGGGGACGTTTTTTATTTAAGTATA-

-AAAAACATACAGATAACCATCTGCGGTGATAAATTATCTCTGCGGTGTTGACATAAA-
 -TTTTTGTATGTCTATTGGTAGACGCCACTATTTAATAGAGACCGCCACAACCTGTATTT-

-TACCACTGGCGGTGATACTGAGCACAT 3' (配列番号: 53)
 -ATGGTGACCGCCACTATGACTCGTGTAGC5' (配列番号: 54)

ClaI

次いで、(c) 唯一の ClaI および KpnI 制限部位の間の小さな配列を以下のオリゴヌクレオチド:

5' CGATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTAC 3'
 (配列番号: 55)

3' TAAACTAAGATCTTCCTCCTTATGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGC 5'
 (配列番号: 56)

ClaI KpnI

で置き換える。

次いで、発現プラスミド pAMG22 は、PCR 重複オリゴ突然変異誘発および DNA 配列置換によって一連の部位特異的塩基変化を作成することにより pCFM1656 から誘導できる。プラスミド複製プロモーター PcopB の直ぐ 5' 側の BglII 部位 (プラスミド bp # 180) で出発し、プラスミド複製遺伝子に向けて進行し、塩基対変化は以下の通りである。

<u>pAMG22 bp #</u>	<u>pCFM1656におけるbp</u>	<u>pAMG22における以下のものへのbp変化</u>
# 204	T/A	C/G
# 428	A/T	G/C
# 509	G/C	A/T
# 617	- -	2のC/C bp挿入
# 679	G/C	T/A
# 980	T/A	C/G
# 994	G/C	A/T
# 1004	A/T	C/G
# 1007	C/G	T/A
# 1028	A/T	T/A
# 1047	C/G	T/A
# 1178	G/C	T/A
# 1466	G/C	T/A
# 2028	G/C	bp欠失
# 2187	C/G	T/A
# 2480	A/T	T/A
# 2499-2502	AGTG TCAC	GTCA CAGT
# 2642	TCCGAGC AGGCTCG	7 bp欠失
# 3435	G/C	A/T
# 3446	G/C	A/T
# 3643	A/T	T/A

唯一のA a t I I (p C F M 1 6 5 6における位置# 4 3 6 4) およびS a c
I I (p C F M 1 6 5 6における位置# 4 5 8 5) の間のD N A配列を以下のD
N A配列で置き換える。

[AatII 粘着末端] (pAMG22 における位置#4358)

```

5'      GCGTAACGTATGCATGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAA-
3' TGCACGCATTGCATACGTACCAGAGGGGTACGCTCTCATCCCTTGACGGTCCGTAGTT-

-ATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCTGGTG-
-TATTTTGCTTTCCGAGTCAGCTTTCTGACCCGGAAAGCAAAATAGACAACAAACAGCCAC-

-AACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGG-
-TTGCGAGAGGACTCATCTGTTTAGGCGGCCCTCGCCTAAACTTGCAACGCTTCGTTGCC-

-CCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAG-
-GGGCCTCCCACCGCCGCTCTGCGGGCGGTATTTGACGGTCCGTAGTTTAATTCGTCTTC-

-GCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTCGTTTCTACAAACTCTTTTGTTTATTTTCTAAAT-
-CGGTAGGACTGCCTACCGGAAAAACGCAAGATGTTTGAGAAAACAAATAAAAAGATTTA-

      AatII
-ACATTCAAATATGGACGTCTCATAATTTTTAAAAAATTCATTTGACAAATGCTAAAAATC-
-TGTAAGTTTATACCTGCAGAGTATTAAAAATTTTTAAGTAACTGTTTACGATTTTAAG-

-TTGATTAATATTCTCAATTGTGAGCGCTCACAATTTATCGATTTGATTCTAGATTTGTTT-
-AACTAATTATAAGAGTTAACACTCGCGAGTGTTAAATAGCTAAACTAAGATCTAACTCA-

-TAACTAATTAAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGAGCTCACTAGTGT-
-ATTGATTAATTTCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGCTCGAGTGATCACA-

      SacII
-CGACCTGCAGGGTACCATGGAAGCTTACTCGAGGATCCGCGGAAAGAAGAAGAAGAAGAA-
-GCTGGACGTCCCATGGTACCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCCTTCTTCTTCTTCTTCTT-

-GAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGCATAACC-
-CTTTCGGGCTTTCCTTCGACTCAACCGACGACGGTGGCGACTCGTTATTGATCGTATTGG-

-CCTTGGGGCCTCTAAACGGGCTTTGAGGGGTTTTTGTCTGAAAGGAGGAACCGCTCTTCA-
-GGAACCCCGGAGATTTGCCCGAAGTCCCCAAAAACGACTTTCCTCCTTGGCGAGAAGT-

-CGCTCTTCACGC 3' (配列番号: 58)
-GCGAGAAGTG 5' (配列番号: 57)

```

[SacII 粘着末端] (pAMG21 における位置#5024)

この置換DNA配列の粘着末端の連結の間に、AatIIおよびSacII部位の外部は破壊される。置換DNAには唯一のAatIIおよびSacII部位がある。

B. ヒトOPG Met [32-401]

この実施例では、使用した発現ベクターはpAMG21、すなわちlux P Rプロモーター (lux発現系の記載については米国特許第5,169,318号参照) から下流の遺伝子の挿入のための適当な制限部位を含有するpCFM1656 (ATCC受託番号69576) の誘導体であった。使用した宿主細胞はGM120 (ATCC受託番号55764) であった。この宿主はlacIQプロモーターおよび原核生物イー・コリK12宿主の宿主染色体中の第2の部位に

挿入された *lac I* 遺伝子を有する。他の通常に使用されるイー・コリ発現ベクターおよび宿主細胞も発現に適する。

N-末端メチオニンおよびヒトOPGポリペプチドのアミノ酸32-401につきコードするDNA配列を、以下のごとく、プラスミド発現ベクターpAMG21中の *lux PR* プロモーターの制御下に置いた。これを達成するために、ヒトOPG cDNAを含有するプラスミドpRcCMV-Hu OPG D

NAを鋳型として用い、各サイクルが20秒間の94℃、続いて30秒間の37℃、続いて30秒間の72℃である30サイクルの熱サイクルを行い、オリゴヌクレオチド#1257-20および#1257-19をプライマーとして用いるPCRを行った。得られたPCR試料をアガロースゲル上で分離し、PCR産物を切り出し、精製し、KpnIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで制限消化し、精製した。T4ポリヌクレオチドキナーゼおよびATPを用い、合成オリゴヌクレオチド#1257-21および#1257-22を個々にリン酸化し、次いで、一緒に混合し、94℃で加熱し、ゆっくりと室温まで冷却して、NdeIおよびKpnI粘着末端を含有するオリゴヌクレオチドリンカーデュプレックスを形成させた。NdeIおよびKpnI粘着末端（図14A参照）ならびにオリゴプライマー#1257-20および#1257-19（前記参照）を用いて生じたKpnIおよびBamHI消化の精製PCR産物を含有するオリゴヌクレオチド#1257-21および#1257-22の間に形成されたリン酸化リンカーデュプレックスを、標準的に組換えDNA法（図14Aおよび後記配列参照）を用い、プラスミドベクターの2つの部位、すなわちNdeI

部位およびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。合成リンカーはコー・コリのコドンを利用し、N-末端メチオニンを供した。

2つのクローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、ヒトOPGインサートを引き続き配列決定して確認した。枠内でメチオニンが直前に先行するヒトOPGポリペプチドのアミノ酸32-401を含有する得られたpAMG21プラスミドをpAMG21-huOPG met [32-401] またはpAMG2

1-huOPG met [32-401] という。

Oligo#1257-19

5'-TACGCACTGGATCCTTATAAGCAGCTTATTTTACTGATTGGAC-3'

(配列番号: 59)

Oligo#1257-20

5'-GTCCTCCTGGTACCTACCTAAAACAAC-3' (配列番号: 60)

Oligo#1257-21

5'-TATGGATGAAGAACTTCTCATCAGCTGCTGTGTGATAAATGTCC

GCCGGGTAC -3' (配列番号: 61)

Oligo#1257-22

5'-CCGGCGGACATTTATCACACAGCAGCTGATGAGAAGTTTCTTCATCCA-3'

(配列番号: 47)

誘導に先立って、イー・コリGM120中のpAMG21-huOPG met [32-401] の20 μ g/mlカナマイシンを含有する2XYT培地中培養物を30℃でインキュベートした。luxPRプロモーターからのhuOPG met [32-401] 遺伝子産物の誘導は、合成自己誘導剤N-(3-オキソヘキサノイル)-DL-ホモセリンラク톤を30 ng/mlの最終濃度まで培養培地に添加することによって達成され、培養物をさらに6時間、30℃または37℃いずれかでインキュベートした。6時間後、この細菌培養物を封入体の存在について顕微鏡によって調べ、次いで、遠心によってペレット化した。屈折性封入体が誘導された培養中に観察され、これは、組換えhuOPG met [32-401] 遺伝子産物がイー・コリ中で不溶性にて産生されたことを示す。細菌ペレットを10 mMトリス-HCl/pH 8、1 mM EDTAに再懸濁し、2×Laemmli試料緩衝液を1×最終まで、および β -メルカプトエタノールを5%最終濃度まで添加することによって直接溶解させ、SDS-PAGEによって分析した。30℃で未誘導の培養の全細胞溶解物であるレーン2と比較し、30℃および37℃で誘導された培養の全細胞溶解物を含有す

るSDS-PAGEで実質的により大きい強度のクーマシー染色されたほぼ42

kDaのバンドが観察された(図14B)。予期の遺伝子産物は長さが370アミノ酸で、約42.2kDaの予期の分子量を有するであろう。37℃における6時間の誘導に続き、さらなる培養をペレット化し、封入体の単離のために加工するか(後記参照)、あるいはマクロ流動化によって加工した。マイクロ流動化のために加工したペレットを25mMトリス-HCl/pH8、0.5M NaCl緩衝液に再懸濁し、Microfluidizer Model 1108 (Microfluidics Corp.)を20回通し、収集した。アリコットを収集試料(マイクロ流動化した全溶解物)から取り出し、残りを20,000×gで20分間ペレット化した。遠心後に上清を取り出し(マイクロ流動化可溶性画分)、ペレットを25mMトリス-HCl/pH8、0.5M NaCl、6M尿素溶液に再懸濁した(マイクロ流動化不溶性画分)。全可溶性または不溶性画分いずれかのアリコットに等容量の2×Laemmli試料緩衝液とβ-メルカプトエタノールを5%最終濃度まで添加した。次いで、試料をSDS-PAGEによって分析した。有意量の組換えhuOPG net [32

-401] 遺伝子産物が不溶性画分で見い出されたようであった。組換え蛋白質を精製するために、以下のごとくに封入体を精製した。4,900×g、4℃にて、JS-4.2ローターを装備したBeckman J-6B遠心機中、密度勾配遠心によって15分間で細菌細胞を培地から分離した。細菌ペレットを水5mlに再懸濁し、次いで、水で10mlの最終容量に希釈した。この懸濁液を、水中で冷却したステンレス鋼カップに移し、標準チップを装備したBranson Sonifierを用い、音波破壊に付した(出力セッティング=5、衝撃周波=95%、80噴出)。音波処理した細胞懸濁液を、195,000×g、23℃にて、TLA 100.3ローターを装備したBeckman Optima TLX超遠心機で5ないし10分間遠心した。上清を捨て、ペレットをスクワートボトルからの水流ですすいだ。ペレットをミクロスパチュラで掻くことによって集め、ガラス製ホモゲナイザー(15ml容量)に移した。Percoll溶液(75%液体Percoll、0.15M塩化ナトリウム)5mlをホモゲナイザーに添加し、内容物が均一に懸濁するまでホモゲナイズした。Perc

o 1 1 溶液の添加によって容量を 1 9 . 5 m l まで増加させ、混合

し、3つのBeckman Quick-Sealチューブ(13×32mm)に分配した。製造業者の指示に従ってチューブをシールした。23℃、20,000rpm(21,600×g)にて、Beckman TLA100.3ローター中でチューブを30分間回転させた。チューブを適当なバンドパターンにつき調べた。屈折性封入体を回収するために、密度画分を回収し、プールし、次いで水で希釈した。遠心によって封入体をベレット化し、SDS-PAGEによって蛋白質濃度を見積もった。

後記するごとく単離した封入体のアリコットを5%β-メルカプトエタノールを含有する1×Laemmli試料緩衝液に溶解させ、SDS-PAGEで分離し、単離した封入体は高度に精製された組換えhuOPG[32-401]遺伝子産物を供する。封入体をSDD-ポリアクリルアミドゲルで分離した後に観察された主要～42kDaバンドを別のゲルから切り出し、実質的には記載されているごとくに(Matsudairaら, J. Biol. Chem. 262, 10-35 (1987)) N-末端アミノ酸配列を決定した。以下の配列を19サイクル後に決定した。

NH₂-MDEETSHQLLCDKCPPGTY-COO

H (配列番号: 62)

この配列は、細菌発現ベクターによって供されたメチオニン残基によって生じた、pAMG21 Hu-OPG met [32-401] 発現ベクターによってコードされた最初の19アミノ酸と同一であることが判明した。

C. ヒトOPG met [22-401]

N-末端メチオニンおよびヒトOPGのアミノ酸22ないし401をコードするDNA配列を、以下のごとく、原核生物プラスミド発現ベクターpAMG21中のluxPRプロモーターの制御下に置いた。pAMG21-huOPG met [32-401] (セクションB参照)の単離されたプラスミドDNAをK

p n I および B a m H I 制限エンドヌクレアーゼで切断し、得られた断片をアカゲロースゲルで分離した。B 断片（～1064 m p 断片）を標準的な方法を用いてゲルから単離した。セクション B に記載された方法を用い、合成オリゴヌクレオチド（オリゴ）# 1 2 6 7 - 0 6 および # 1 2 6 7 - 0 7 を個々にリン酸化し、N d e I および K p n I 粘着末端を含有する、オリゴリンカーデュプレックスを形成させた。合成リンカーデ

ュプレックスはイー・コリのコドンを利用し、N-末端メチオニンを供した。N d e I および K p n I 粘着末端を含有するリン酸化オリゴリンカーおよび K p n I および B a m H I 制限エンドヌクレアーゼで消化した p A M G 2 1 - h u O P m e t [3 2 - 4 0 1] の単離された～1064 b p 断片を、標準的な組換え DNA 法を用い、p A M G 2 1 の N d e I および B a m H I 部位の間に方向付けて挿入した。製造業者のプロトコルを利用する電気泳動によって、連結混合物をイー・コリ宿主 3 9 3 に形質転換した。クローンを選択し、プラスミド DNA を単離し、DNA 配列決定を行って、h u O P G - m e t [2 2 - 4 0 1] 遺伝子の DNA 配列を確認した。

初稿 #1267-06

5'-TAT GGA AAC TTT TCC TCC AAA ATA TCT TCA TTA TGA TGA
AGA AAC TTC TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TCC GCC GGG
TAC-3' (配列番号: 63)

初稿 #1267-07

5'-CCG GCG GAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAG AAG TTT
CTT CAT CAT AAT GAA GAT ATT TTG GAG GAA AAG TTT CCA-3'
(配列番号: 64)

イー・コリ宿主 3 9 3 中 p A M G 2 1 - h u O P H - m e t [2 2 - 4 0 1] の培養物を 20 μ g / m l カナマイシンを含有する 2 X Y T 培地中に置き、誘導に先立って、30℃でインキュベートした。ベクター p A M G 2 1 の l u x P R プロモーターからの組換え遺伝子産物発現の誘導は、合成自己誘導剤 N - (3 - オキサヘキサノイル) - D L - ホモセリンラク톤を 30 n g / m l の最終濃度まで培養培地に添加し、さらに 6 時間、30℃または 37℃でインキュベーション

ンすることによって達成した。6時間後、細菌培養を遠心によってペレット化した(=30℃ I+6または37℃ I+6)。また、この細菌培養物をインキュベーションの直前にペレット化し、あるいは別法として、自己誘導剤を別の培地に添加せず、これを30℃でさらに6時間インキュベートして未誘導(UI)培養(30℃UI)を得た。30℃ Pre I、30℃UI、30℃I+6、または37℃I+6いずれかの細菌ペレットを再懸濁し、溶解させ、セクションBに記載したごとくにSDS-ポリアクリルアミド電気泳動によって分析した。ポリアクリルアミドゲルをクーマシーブルーで染色しおよび/またはニトロセルロースにウェスタン転移させ、実施例10に記載したごとくにウサギ抗

-mu OPG-Fcポリクローナル抗体で免疫プローブした。誘導後の遺伝子産物のレベルを未誘導(30℃UI)またはプレ誘導(30℃ Pre I)試料いずれかと比較した。

D. ネズミOPG met [22-401]

N-末端メチオニンおよびネズミ(mu)OPG(OPG)ポリペプチドのアミノ酸22ないし401をコードするDNA配列を、以下のごとく、原核生物プラスミド発現ベクターpAMG21中のluxPRプロモーターの制御下に置いた。オリゴヌクレオチド#1257-16および#1257-15をプライマーとして、プラスミドpRcCMV-Mu OPG DNAを鋳型として用い、セクションBに記載した熱サイクリング条件を用い、PCRを行った。PCR産物を精製し、セクションBに記載したごとくにKpnIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで切断した。合成オリゴ#1260-61および#1260-82を個々にリン酸化し、セクションBに記載した方法を用い、NdeIおよびKpnI粘着末端でオリゴリンカーデュプレックスを形成させた。合成リンカーデュプレックスはイー・コリのコドンを利用し、N-末端メチオニンを供した。NdeIおよびKpnI粘着末端ならびにオリゴプライ

マー#1257-16および#1257-15を用いて創製されたKpnIおよびBamHI消化され精製されたPCR産物を含有するオリゴ#1260-61

および#1260-82の間に形成されたリン酸化リンカーデュプレックスを標準的な方法を用いてpMAG21のNdeIおよびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってMuOPG met [22-401] 遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後におけるプラスミドpAMG21-MuOPG met [22-401] を保有する393細胞の培養からの組換えMuOPG met [22-401] ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

例1 #1257-15

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT AAG CAG CTT ATT TTC ACG
GAT TGA AC-3' (配列番号: 65)

例2 #1257-16

5'-GTG CTC CTG GTA CCT ACC TAA AAC AGC ACT GCA CAG
TG-3' (配列番号: 66)

例3 #1260-61

5'-TAT GGA AAC TCT GCC TCC AAA ATA CCT GCA TTA CGA
TCC GGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TGC TCC
GGG TAC-3' (配列番号: 67)

例4 #1260-82

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG
TTT CCG GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CCA-
3' (配列番号: 68)

E. ネズミOPG met [32-401]

N-メチオニンおよびネズミOPGのアミノ酸32ないし401をコードするDNA配列を、以下のごとく、原核生物プラスミド発現ベクターpAMG21中のluxPRプロモーターの制御下に置いた。これを達成するために、オリゴヌクレオチド#1267-08および#1267-09を個々にリン酸化し、セクションBに記載した方法を用いてオリゴリンカーデュプレックスを形成させた。合成リンカーデュプレックスはイー・コリのコドンを利用し、N-末端メチオニ

ンを供した。Nde I および Kpn I 粘着末端ならびに前記した（セクションD 参照）Kpn I および BamH I 消化された精製されたPCR産物を含有するオリゴ#1267-08および#1267-09の間に形成されたリン酸化リンカーデュプレックスを標準的な方法を用いてpMAG21のNde I および BamH I 部

位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってMuOPG met [32-401] 遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後におけるpAMG21組換えプラスミドを保有する393細胞の培養からの組換えmuOPG met [32-401] ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

オリゴ #1267-08

5'-TAT GGA CCC AGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA
TAA ATG TGC TCC GGG TAC-3' (配列番号: 69)

オリゴ #1267-09

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG
TTT CTG GGT CCA-3' (配列番号: 70)

F. ネズミOPG met-lys [22-401]

N-メチオニン、続いてのネズミOPGのアミノ酸22ないし401をコードするDNA配列を、原核生物発現ベクターpAMG21中のlux PRプロモーターの制御下に置いた。合成オリゴ#1282-95および#1282-96を個々に

リン酸化し、セクションBに記載した方法を用いてオリゴリンカーデュプレックスを形成させた。合成リンカーデュプレックスはイー・コリのコドンを利用し、N-末端メチオニンを供した。Nde I および Kpn I 粘着末端ならびにセクションDに記載したKpn I および BamH I 消化され精製されたPCR産物を含

有するオリゴ#1281-95および#1282-96の間に形成されたリン酸化リンカーデュプレックスを標準的な方法を用いてpMAG21のNdeIおよびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってMuOPG Met-Lys [22-401] 遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後における組換えpAMG21プラスミドを保有する形質転換393細胞からの組換えMuOPG Met-Lys [22-401] ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

オリゴ #1282-95

5'-TAT GAA AGA AAC TCT GCC TCC AAA ATA CCT GCA TTA
CGA TCC GGA AAC TGG TCA TCA GCT GCT GTG TGA TAA ATG TGC
TCC GGG TAC-3' (配列番号: 71)

オリゴ #1282-96

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG
TTT CCG GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CTT
TCA-3' (配列番号: 72)

G. ネズミOPG met-lys-(his)₇ [22-401]

N-末端残基Met-Lys-His-His-His-His-His-His-His (=MKH)、続いてのネズミOPGのアミノ酸22ないし401をコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21中のlux PRプロモーターの制御下に置いた。オリゴヌクレオチド#1300-50および#1257-15をプライマーとしておよびプラスミドpAMG21-muOPG-met [22-401] DNAを鋳型として用いてPCRを行った。熱サイクリング条件はセクションBに記載した通りである。得られたPCR産物をアガロースゲルで分離し、PCR産物を切り出し、精製し、NdeIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで切断し、精製した。オリゴプライマー#1300-50および

#1257-15を用いて生じたNdeIおよびBamHI消化し精製したPCR産物を標準的な方法を用いてpMAG21のNdeIおよびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってmuOPG MKH [22-401] 遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後における組換えpAMG21プラスミドを保有する形質転換393細胞からの組換えMuOPG MKH [22-401] ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

例1 #1300-50

5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAC ATC ATC ACC ATC ACC ATC
ATG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC TGC ATT ACG AT-3'
(配列番号: 73)

例2 #1257-15

(セクションD参照)

H. ネズミOPG met-lys [22-401] (his)₇

N-末端met-lys、アミノ酸22ないし401ネズミOPG、およびアミノ酸401に続く7個のヒスチジン残基(muOPG MK [22-401]-H₇)をコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21中のlux PRプロモーターの制御下に置いた。オリゴヌクレオチド#1300-49および#1300-51をプライマーとしておよびプラスミドpAMG21-muOPG-met [22-401] DNAを鋳型として用いてPCRを行った。熱サイクリング条件はセクションBに記載した通りである。得られたPCR産物をアガロースゲルで分離し、PCR産物を切り出し、精製し、NdeIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで切断し、精製した。NdeIおよびBamHI消化し精製したPCR産物を標準的な方法を用いてpMAG21のNdeIおよびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、D

NA配列決定を行っ

てmuOPG MK [22-401] -H₇遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後における組換えpAMG21プラスミドを保有する形質転換393細胞からの組換えmuOPG MK-[22-401]-H₇ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

例#1300-49

5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAG AAA CTC TGC CTC CAA AAT
ACC TGC A-3' (配列番号: 74)

例#1300-51

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAA TGA TGG TGA TGG TGA TGA
TGT AAG CAG CTT ATT TTC ACG GAT TGA ACC TGA TTC CCT A-3'
(配列番号: 75)

I. ネズミOPG met [27-401]

N-末端メチオニンおよびネズミOPGのアミノ酸27ないし401をコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21中のlux PRプロモーターの制御下に置いた。オリゴヌクレオチド#1309-74および#1257-15をプライマーとしておよびプラスミドpAM

G21-muOPG-met [22-401] DNAを鋳型として用いてPCRを行った。熱サイクリング条件はセクションBに記載した通りである。得られたPCR産物をアガロースゲルで分離し、PCR産物を切り出し、精製し、Nde IおよびBamH I制限エンドヌクレアーゼで切断し、精製した。Nde IおよびBamH I消化し精製したPCR産物を標準的な方法を用いてpMAG21のNde IおよびBamH I部位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者の protokol を利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってmuOPG-met [27-401] 遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後における組換えpAMG21プラスミドを保有する形質転換393細胞

からの組換えmuOPG-met [27-401] ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

初稿#1309-74

5'-GTT CTC CTC ATA TGA AAT ACC TGC ATT ACG ATC CGG
AAA CTG GTC AT-3' (配列番号: 76)

初稿#1257-15

(See Section D)

J. ヒトOPG met [27-401]

N-末端メチオニンおよびネズミOPGのアミノ酸27ないし401をコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21中のlux PRプロモーターの制御下に置いた。オリゴヌクレオチド#1309-75および#1309-76をプライマーとしておよびプラスミドpAMG21-huOPG-met [27-401] DNAを鋳型として用いてPCRを行った。熱サイクリング条件はセクションBに記載した通りである。得られたPCR産物をアガロースゲルで分離し、PCR産物を切り出し、精製し、AseIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで制限切断し、精製した。AseIおよびBamHI消化し精製したPCR産物を標準的な方法を用いてpMAG21のNdeIおよびBamHI部位

の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってhuOPG-met [22-401] 遺伝子のDNA配列を確認した。

組換えpAMG21プラスミドを保有するトランスフェクトした393細胞からの誘導後における組換えhuOPG-met [27-401] ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

例1 #1309-75

5'-GTT CTC CTA TTA ATG AAA TAT CTT CAT TAT GAT GAA
GAA ACT T-3' (配列番号: 77)

例2 #1309-76

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT AAG CAG CTT ATT TTT ACT
GAT T-3' (配列番号: 78)

K. ネズミOPG met [22-180]

N-末端メチオニンおよびネズミOPGのアミノ酸22ないし180をコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21のlux PRプロモーターの制御下に置いた。オリゴヌクレオチド#1309-72および#1309-73をプライマーとしておよびプラスミドpAMG21-muOPG-met [22-401] DNAを鋳型として用いてPCRを行った。熱サイクリング条件はセクションBに記載した通りである。得られたPCR産物をアガロースゲルで分離し、PCR産物を切り出し、精製し、NdeIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで制限切断し、精製した。NdeIおよびBamHI消化し精製した前記PCR産物を標準的な方法を用いてpMAG21のNdeIおよびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。連結物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってmuOPG-met [22-180] 遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後における組換えpAMG21プラスミドを保有する形

質転換393細胞からの組換えmuOPG-met [22-180] ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

オリゴ #1309-72

5'-GTT CTC CTC ATA TGG AAA CTC TGC CTC CAA AAT ACC
TGC A-3' (配列番号: 79)

オリゴ #1309-73

5'-TAC GCA CTG GAT CCT TAT GTT GCA TTT CCT TTC TGA
ATT AGC A-3' (配列番号: 80)

L. ネズミOPG met [27-180]

N-末端メチオニンおよびネズミOPGのアミノ酸27ないし180をコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21のlux PRプロモーターの制御下に置いた。オリゴヌクレオチド#1309-74 (セクションI参照) および#1309-73 (セクションK参照) をプライマーとしておよびプラスミドpAMG21-muOPGmet [22-401] DNAを鋳型として用いてPCRを行った。熱サイクリング条件はセクションBに記載した通りである。得られたPCR産物をアガロースゲルで分離し、PCR産

物を切り出し、精製し、Nde I およびBamH I 制限エンドヌクレアーゼで制限切断し、精製した。Nde I およびBamH I 消化し精製した前記PCR産物を標準的な方法を用いてpMAG21のNde I およびBamH I 部位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってmuOPG met [27-180] 遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後における組換えpAMG21プラスミドを保有する形質転換393細胞の培養からの組換えmuOPG met [27-180] ポリペプチドの発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

M. ネズミOPG met [22-189] およびmet [22-194]

N-末端メチオニンおよびネズミOPGのアミノ酸22ないし189、または22ないし194いずれかをコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21のlux PRプロモーターの制御下に置いた。セ

クシヨン

Bに記載した方法を用い、合成オリゴヌクレオチド#1337-92および#1337-93(=muOPG-189リンカー)または#1333-57および#1337-58(=muOPG-194リンカー)の対を個々にリン酸化して、オリゴリンカーデュプレックス対を形成させた。pAMG21-muOPG-met[22-401]の精製プラスミドDNAをKpnIおよびBspEI制限エンドヌクレアーゼで切断し、得られたDNA断片をアガロースゲルで分離した。標準的なDNA方法を用いて~413bp B断片を単離した。BspEIおよびBamHI粘着末端、および前記KpnIおよびBspEI制限エンドヌクレアーゼで消化したプラスミドpAMG21-muOPG-met[22-401]の単離された~413bp B断片を含有するオリゴ#1337-92および#1337-93(muOPG-189リンカー)またはオリゴ#1333-57および#1333-58(muOPG-194リンカー)いずれかの間に形成されたリン酸化オリゴリンカーデュプレックスを標準的な方法を用いてpAMG21-muOPG-met[22-401]のKpnIおよびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。各連結混合物を製造業者のプロ

トコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってmuOPG-met[22-189]またはmuOPG-met[22-194]遺伝子のDNA配列を確認した。

393細胞に形質転換した組換えpAMG21プラスミドからの組換えmuOPG-met[22-189]およびmuOPG-met[22-194]の発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

初カ #1337-92

5'-CCG GAA ACA GAT AAT GAG-3' (配列番号: 81)

初カ #1337-93

5'-GAT CCT CAT TAT CTG TTT-3' (配列番号: 82)

初カ #1333-57

5'-CCG GAA ACA GAG AAG CCA CGC AAA AGT AAG-3'
(配列番号: 83)

初カ #1333-58

5'-GAT CCT TAC TTT TGC GTG GCT TCT CTG TTT-3'
(配列番号: 84)

N. ネズミOPG met [27-189] およびmet [27-194]

N-末端メチオニンおよびネズミOPGのアミノ酸27ないし189、または27ないし194いずれかをコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21のlux PRプロモーターの制御下に置いた。BspEIおよびBamHI粘着末端、およびKpnIおよびBspEI制限エンドヌクレアーゼで消化したプラスミドpAMG21-muOPG-met [22-401] の単離された~413bp B断片を含有するリン酸化オリゴリンカー「muOPG-189リンカー」または「muOPG-194リンカー」(セクションM参照) いずれかを標準的な方法を用いてプラスミドpAMG21-muOPG-met [27-401] のKpnIおよびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。各連結物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってmuOPG-met [27-189] またはmuOPG-met [27-194] 遺伝子のDNA配列を確認した。

組換えpAMG21プラスミドを保有する393細胞の誘導後における組換えmuOPG-met [27-189] およびmuOPG-met [27-194] の発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

O. ヒトOPG met [22-185]、met [22-189]、met [22-194]

N-末端メチオニンおよびヒトOPGのアミノ酸22ないし185、22ないし189、または22ないし194いずれかをコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクターpAMG21のlux PRプロモーターの制御下に置いた。セクションBに記載した方法を用い、合成オリゴヌクレオチド#1331-87および#1331-88(=huOPG-185リンカー)、#1331-89および#1331-90(=huOPG-189リンカー)、または#1331-91 & #1331-91(=huOPG-194リンカー)の対を個々にリン酸化して、各々、オリゴリンカーデュプレックス対を形成させた。pAMG21-huOPG-met [27-401]の精製プラスミドDNAをKpnIおよびNdeI制限エンドヌクレアーゼで制限切断し、得られたDNA

断片をアガロースゲルで分離した。標準的な組換えDNA法を用いて~407bp B断片を単離した。オリゴ#1331-87および#1331-88(huOPG-185リンカー)、オリゴ#1331-89および#1331-90(huOPG-189リンカー)、またはオリゴ#1331-91および#1331-92(huOPG-194リンカー)[各リンカーはNdeIおよびBamHI粘着末端を含有する]いずれかと、前記KpnIおよびNdeI制限エンドヌクレアーゼで消化したプラスミドpAMG-huOPG-met [27-401]の単離された~407bp B断片との間に形成させたリン酸化オリゴリンカーデュプレックスを標準的な方法を用いてプラスミドpAMG21-huOPG-met [22-401]のKpnIおよびBamHI部位の間に方向付けて挿入した。各連結物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行ってhuOPG-met [22-185]、huOPG-met [22-189]、またはhuOPG-met [22-194]遺伝子のDNA配列を確認した。

誘導後における組換え pAMG 21 プラスミドを保有する形質転換 393 細胞における組換え huOPG-met [22-185]、huOPG-met [22-189]、または huOPG-met [22-194] の発現をセクション C に記載した方法を用いて測定した。

例 1331-87

5'-TAT GTT AAT GAG-3' (配列番号: 85)

例 1331-88

5'-GAT CCT CAT TAA CA-3' (配列番号: 86)

例 1331-89

5'-TAT GTT CCG GAA ACA GTT AAG-3' (配列番号: 87)

例 1331-90

5'-GAT CCT TAA CTG TTT CCG GAA CA-3' (配列番号: 88)

例 1331-91

5'-TAT GTT CCG GAA ACA GTG AAT CAA CTC AAA AAT
AAG-3' (配列番号: 89)

例 1331-92

5'-GAT CCT TAT TTT TGA GTT GAT TCA CTG TTT CCG GAA
CA-3' (配列番号: 90)

P. ヒトOPG met [27-185]、met [27-189]、met [27-194]

N-末端メチオニンおよびヒトOPGポリペプチドのアミノ酸27ないし185、27ないし189、または27ないし194いずれかをコードするDNA配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクター pAMG 21 の lux PR プロモーターの制御下に置いた。各々 Nde I および BamH I 粘着末端を含有するリン酸化オリゴリンカー「huOPG-185 リンカー」、「huOPH-189 リンカー」、または「huOPG-194 リンカー」(セクション O 参照)、および Kpn I および Nde I 制限エンドヌクレアーゼで消化したプラスミド pAMG 21-huOPG-met [27-401] の単離された ~407 bp B 断片(セクション O 参照)を標準的な方法を用いてプラスミド pAMG 21-

h u O P G - m e t [2 2 - 4 0 1] の K P n I および B a m H I 部位の間に方向付けて挿入した（セクション J 参照）。各連結物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主 3 9 3 に形質転換した。クローンを選択し、プラスミド DNA を単離し、DNA 配列決定を行って h u O P G - m e t [2

7 - 1 8 5] 、 h u O P G - m e t [2 7 - 1 8 9] 、または h u O P G - m e t [2 7 - 1 9 4] 遺伝子の DNA 配列を確認した。

組換え p A M G 2 1 プラスミドからの組換え h u O P G - m e t [2 7 - 1 8 5] 、 h u O P G - m e t [2 7 - 1 8 9] 、または h u O P G - m e t [2 7 - 1 9 4] の発現をセクション C に記載した方法を用いて測定した。

Q. ネズミ O P G m e t [2 7 - 4 0 1] (P 3 3 E 、 G 3 6 S 、 A 4 5 P)

N-末端メチオニンおよびヒト O P G のアミノ酸 2 7 ないし 4 8 、続いてネズミ O P G のアミノ酸 4 9 ないし 4 0 1 をコードする DNA 配列を、以下のごとくに、原核生物発現ベクター p A M G 2 1 の l u x P R プロモーターの制御下に置いた。p A M G 2 1 - h u O P G - m e t [2 7 - 4 0 1] の精製プラスミド DNA （セクション J 参照）を A a t I I および K p n I 制限エンドヌクレアーゼで切断し、標準的な DNA 法を用いて、アカゲロースゲルから ~ 1 0 7 5 b p

B 断片を単離した。さらに、プラスミド p A M G 2 1 - m u O P G - m e t [2 2 - 4 0 1] DNA （セクション D 参照）を K p n I および B

a m H I 制限エンドヌクレアーゼで消化し、前記したごとくに ~ 1 0 6 4 b p B 断片を単離した。A a t I I 及び K p n I 粘着末端を含有する単離された ~ 1 0 7 5 b p p A M G 2 1 - h u O P G - m e t [2 7 - 4 0 1] 制限断片（前記参照）、K p n I および B a m H I 粘着末端を含有する ~ 1 0 6 4 b p p A M G 2 1 - m u O P G - m e t [2 2 - 4 0 1] 制限断片、および A a t I I および B a m H I 粘着末端を含有し、A a t I I 及び B a m H I の間の p A M G 2 1 の核酸配列に対応する ~ 5 0 4 3 b p 制限断片を標準的な DNA 法を用いて連結

した。連結物を製造業者のプロトコルを利用するエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主393に形質転換した。標準的なDNA法を用い、クローンを選択し、プラスミド中の組換えインサートの存在を確認した。muOPG-27-401 (P33E、G365、A45P) 遺伝子。muOPG残基27ないし48の、huOPG残基27ないし48での置換から、プロリン-33からグルタミン酸-33への、グリシン-36からセリン-36への、およびアラニン-45からプロリン-45へのmuOPGにおけるアミノ酸変化が得られた。

組換え pAMG21 プラスミドを保有する形質転換393細胞

胞からの組換えmuOPG-met [27-401] (P33E、G365、A45P) の発現をセクションCに記載した方法を用いて測定した。

R. ネズミOPG met-lys-(his)₇-ala-ser-(asp)₄-lys [22-401] (A45T)

N-末端Hisタグおよび(NH₂からCOOH末端へ) Met-Lys-His-His-His-His-His-His-Ala-Ser-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (=HEK) であるエントロキナーゼ認識配列、続いてネズミOPGポリペプチドのアミノ酸22ないし401をコードするDNA配列を以下のごとくにlacリプレッサー調節Ps4プロモーターの制御下に置いた。pAMG22-His (セクションA参照) をNheIおよびBamHI制限エンドヌクレアーゼで消化し、標準的なDNA法を用いて大きな断片(A断片)をアガロースゲルから単離した。先に記載した方法(セクションB参照)を用いて、オリゴヌクレオチド#1282-91および#1282-92を個々にリン酸化して、オリゴリンカーデュプレックスを形成させた。標準的なDNA法を用い、NheIおよびKpnI粘着末端を含有するオリゴ

#1282-91および#1282-92の間に形成されたリン酸化リンカーデュプレックス、前記したKpnIおよびBamHI消化し精製したPCR産物(セクションD参照)、およびNheIおよびBamHIで消化したベクターpAMG22-HisのA断片を連結した。連結物を製造業者のプロトコルを利用す

るエレクトロポレーションによってイー・コリ宿主GM120に形質転換した。クローンを選択し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列決定を行って、muOPG-HEK [22-401] 遺伝子のDNA配列を確認した。DNA配列決定により、muOPGポリペプチドのアラニン-45のトレオニンへの単一アミノ酸変化が結果となる天然muOPG配列における擬似突然変異が明らかとされた。

合成自己誘導剤の添加の代わりにIPTGを最終0.4mMに添加して誘導を達成する以外は、セクションCに記載されのと同様の方法を用い、組換えpAMG21プラスミドを保有するGM120細胞からの組換えmuOPG-HEK [22-401] (A45T) の発現を測定した。

例1 #1282-91

5'-CTA GCG ACG ACG ACG ACA AAG AAA CTC TGC CTC CAA
AAT ACC TGC ATT ACG ATC CGG AAA CTG GTC ATC AGC TGC TGT
GTG ATA AAT GTG CTC CGG GTA C-3' (配列番号: 91)

例2 #1282-92

5'-CCG GAG CAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC CAG
TTT CCG GAT CGT AAT GCA GGT ATT TTG GAG GCA GAG TTT CTT
TGT CGT CGT CGT CG-3' (配列番号: 92)

S. ヒトOPG met-arg-gly-ser-(his)6 [22-401]

8つのオリゴヌクレオチド（後記で示す1338-09ないし1338-16）を設計して、重複する二本鎖DNAとして175塩基の断片を得た。オリゴをアニールし、連結し、5' および3' オリゴをPCRプライマーとして用いて、大量の175塩基断片を得た。最終PCR遺伝子産物を制限エンドヌクレアーゼで消化して断片が得られ、これはヒトOPGのN-末端28コドンが置き換えられている。ClaIおよびKpnI消化のPCR産物を、やはりClaIおよびKpnIで切断されているpAMG21-huOPG [27-401] に挿入した。連結したDNAをイー・コリ株393のコンピテント宿主細胞に形質転換した。組換え蛋白質産物を生成し、正しいヌクレオチド配列を有する遺伝子融合を

保有する能力につきクロー

ンをスクリーニングした。蛋白質発現レベルを50mlの振盪フラスコ実験により測定した。全細胞溶解物および音波処理ペレットを、ネズミ抗-O P G抗体を用い、クーマシー染色PAGEおよびウェスタン分析によって、構築体の発現につき分析した。その結果大きな封入体および蛋白質が形成されるh u O P G M e t - A r g - G l y - S e r - (H i s) ₆ [2 2 - 4 0 1] の発現を不溶性(ペレット)画分に突き止めた。

1338-09

ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GA (配列番号: 93)

1338-10

TTT GTT TTA ACT AAT TAA AGG AGG AAT AAA ATA TGA GAG GAT CGC ATC AC
(配列番号: 94)

1338-11

CAT CAC CAT CAC GAA ACC TTC CCG CCG AAA TAC CTG CAC TAC GAC GAA GA
(配列番号: 95)

1338-12

AAC CTC CCA CCA GCT GCT GTG CGA CAA ATG CCC GCC GGG TAC CCA AAC A
(配列番号: 96)

1338-13

TGT TTG GGT ACC CGG CGG GCA TTT GT (配列番号: 97)

1338-14

CGC ACA GCA GCT GGT GGG AGG TTT CTT CGT CGT AGT GCA GGT ATT TCG GC
(配列番号: 98)

1338-15

GGG AAG GTT TCG TGA TGG TGA TGG TGA TGC GAT CCT CTC ATA TTT TAT T
(配列番号: 99)

1338-16

CCT CCT TTA ATT AGT TAA AAC AAA TCT AGT ATC AAA TCG ATT GTG TTT GT
(配列番号: 100)

T. ヒトOPG met-lys [22-401] およびmet (lys)₃ [22-401]

ヒトOPG [22-401] のmet-lysおよびmet-(lys)₃バージョンを構築するために、重複するオリゴヌクレオチドを設計して、適当な数のリシン残基を付加した。各構築体につき2つのオリゴを設計して、重複させ、最終産物を得るための2ラウンドのPCRが可能となった。第1のPCR反応についての鋳型はヒトOPG 22-401 遺伝子を含むプラスミドDNA調製であった。第1のPCRはリシン残基を付加した。第2のPCRは第1ラウンドの生成物を使用し、第1の制限部位C1aIに配列を逆付加した。

最終CR遺伝子産物を制限エンドヌクレアーゼC1aIおよびKpnIで消化し、これはhu OPGのN-末端の28コ

ドンを置き換えた。次いで、やはり2つの制限エンドヌクレアーゼで消化してあるプラスミドpAMG21-hu OPG [27-401] に連結した。連結したDNAをイー・コリ株393のコンピテント宿主細胞に形質転換した。組換え蛋白質産物を生成し、正しいヌクレオチド配列を有する遺伝子融合を保有する能力につきクローンをスクリーニングした。蛋白質発現レベルを50mlの振盪フラスコ実験により測定した。全細胞溶解物および音波処理ペレットを、ネズミ抗-OPG抗体を用い、クーマシー染色PAGEおよびウェスタン分析によって、構築体の発現につき分析した。いずれの構築体も蛋白質発現の検出可能なレベルを有さず、封入体は見えなかった。DNA配列はDNA配列決定法によって確認した。

Met-Lys huOPG [22-401] を調製するためのオリゴヌクレオチドプライマー

1338-17

ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GAT TTG TTT TAA CTA ATT
AAA GGA GGA ATA AAA TG (配列番号: 101)

1338-18

CTA ATT AAA GGA GGA ATA AAA TGA AAG AAA CTT TTC CTC CAA
AAT ATC (配列番号: 102)

1338-20

TGT TTG GGT ACC CGG CGG ACA TTT ATC ACA C (配列番号: 103)

Met-(Lys)₃ huOPG [22-401] を調製するためのオリゴヌクレオチドプライマー

1338-17

ACA AAC ACA ATC GAT TTG ATA CTA GAT TTG TTT TAA CTA ATT
AAA GGA GGA ATA AAA TG (配列番号: 104)

1338-19

CTA ATT AAA GGA GGA ATA AAA TGA AAA AAA AAG AAA CTT TTC
CTC CAA AAT ATC (配列番号: 105)

1338-20

TGT TTG GGT ACC CGG CGG ACA TTT ATC ACA C (配列番号: 106)

U. ヒトおよびネズミOPG [22-401] /Fc 融合

ヒトIgG1のFc領域をヒトもしくはネズミいずれかのオステオプロテゲリンアミノ酸22ないし401のN-末端において(Fc/OPG [22-401] という)、またはC-末端において(OPG [22-401] /Fcという)融合して、4つのOPG-Fc融合を構築した。Fc融合は実施例7に記載した融合ベクターpFc-A3を用いて構築した。

全ての融合遺伝子は、標準的なPCR技術を用いて構築した。PCR反応用の鋳型は標的遺伝子を含有するプラスミドであった。重複するオリゴを設計して、1の遺伝子のC-末端部分と

他の遺伝子のN-末端部分を合わせた。このプロセスにより、適当なPCR反応が行われた後に、2つの遺伝子が一緒になって正しい読枠にて融合される。最初に、各遺伝子についての1つの「融合」オリゴを、標的遺伝子を担うベクター用にユニバーサルプライマーを用いるPCR反応に付した。相補的「融合」オリゴを他の遺伝子をPCRに付するためのユニバーサルプライマーと共に用いた。この第1のPCR反応の終わりに、2つの別々の産物が得られ、各個々の遺伝子は存在する融合部位を有し、PCRの第2ラウンドを駆動し、所望の融合を生じるのに十分な重複を得た。PCRの第2ラウンドにおいて、第1の2つのPCR産物を、ユニバーサルプライマーと共に、重複領域を介して合わせ、全長融合DNA配列が生成した。

最終PCR遺伝子産物を制限エンドヌクレアーゼXbaIおよびBamHIで消化し、次いで、やはり2つの制限エンドヌクレアーゼで消化してあるベクターpAMG21に連結した。連結されたDNAをイー・コリ株393のコンピテント宿主細胞に形質転換した。組換え蛋白質産物を生成し、正しいヌクレオチド配列を有する遺伝子融合を保有する能力につきクロンをスクリーニングした。蛋白質発現レベルを50mMの振盪フ

ラスコ実験により測定した。全細胞溶解物、音波処理ペレット、および上清を、ネズミ抗-OPG抗体を用い、クーマシー染色PAGEゲルおよびウェスタン分析によって、融合の発現につき分析した。

Fc/huOPG [22-401]

Fc/hu OPG [22-401] 融合ペプチドの発現がクーマシー染色PAGEゲルおよびウェスタンプロットで検出された。細胞は非常に大きな封入体を有し、大部分の産物は不溶性（ペレット）画分にある。以下のプライマーを用いてこのOPG-Fc融合を構築した。

1318-48

CAG CCC GGG TAA AAT GGA AAC GTT TCC TCC AAA ATA TCT TCA
TT (配列番号: 107)

1318-49

CGT TTC CAT TTT ACC CGG GCT GAG CGA GAG GCT CTT CTG CGT
GT (配列番号: 108)

Fc / mu OPG [22-401]

融合ペプチドの発現はクーマシー染色ゲルおよびウェスタンブロットで検出された。細胞は非常に大きな封入体を有し、大

部分の産物は不溶性（ペレット）画分にある。以下のプライマーを用いてこのOPG-Fc融合を構築した。

1318-50

CGC TCA GCC CGG GTA AAA TGG AAA CGT TGC CTC CAA AAT ACC
TGC (配列番号: 109)

1318-51

CCA TTT TAC CCG GGC TGA GCG AGA GGC TCT TCT GCG TGT
(配列番号: 110)

mu OPG [22-401 / Fc]

融合ペプチドの発現はクーマシー染色ゲルおよびウェスタンブロットで検出された。組換え産物の量は、N-末端位にFc領域を有するOPG融合蛋白質よりも少なかった。明らかな封入体は検出されなかった。産物のほとんどは不溶性（ペレット）画分にあるようであった。以下のプライマーを用いてOPG-Fc融合を構築した。

1318-54

GAA AAT AAG CTG CTT AGC TGC AGC TGA ACC AAA ATC

(配列番号: 111)

1318-55

CAG CTG CAG CTA AGC AGC TTA TTT TCA CGG ATT G

(配列番号: 112)

h u O P G [2 2 - 4 0 1] / F c

融合蛋白質の発現はクーマシー染色ゲルでは検出されなにかつたが、かすかなウェスタン陽性シグナルが存在した。明らかな封入体は検出されなかつた。以下のプライマーを用いてこのO P G - F c融合を調製した。

1318-52

AAA AAT AAG CTG CTT AGC TGC AGC TGA ACC AAA ATC

(配列番号: 113)

1318-53

CAG CTG CAG CTA AGC AGC TTA TTT TTA CTG ATT GG

(配列番号: 114)

V. ヒト O P G m e t [2 2 - 4 0 1] - F c 融合 (P 2 5 A)

本構築体は、25位におけるプロリンからアラニンへのアミノ酸変化(P25A)をh u O P G m e t [2 2 - 4 0 1] - F c融合と組み合わせたものである。プラスミドを、当該遺伝子のN-末端の28コドンを除去する制限エンドヌクレアーゼC l a IおよびK p n Iで消化し、得られた小さな(200塩基対未満)断片をゲル精製した。次いで、プロリンからアラ

ニンへの変化を含むこの断片を、該2つの制限エンドヌクレアーゼで消化してあるプラスミドp A M G 2 1 - h u O P G [2 2 - 4 0 1] - F c融合に連結した。連結したDNAをイー・コリ株393のコンピテント宿主細胞に形質転換した。組換え蛋白質産物を生成し、正しいヌクレオチド配列を有する遺伝子融合を保有する能力につきクローンをスクリーニングした。蛋白質発現レベルを50m lの振盪フラスコ実験により測定した。全細胞溶解物および音波処理ペレットを、

ネズミ抗-OPG抗体を用い、クーマシー染色PAGEゲルおよびウェスタン分析によって、融合の発現につき分析した。融合蛋白質の発現レベルがクーマシー染色PAGEゲルおよびウェスタンブロットで検出された。蛋白質は不溶性（ペレット）画分にあった。細胞は大きな封入体を有していた。

W. ヒトOPG met [22-401] (P25A)

原核生物発現ベクターpAMG21中のlux_Pプロモーターの制御下にある、N-末端メチオニンおよび25位のプロリンがアラニンによって置換されたヒトOPGのアミノ酸22ないし401をコードするDNA配列を以下のごとくに構築した。合成オリゴ#1289-84および1289-85をア

ニールして、XbaIおよびKpnI粘着末端を持つオリゴリンカーデュプレックスを形成させた。合成リンカーデュプレックスは最適なイー・コリのコドンを利用し、N-末端メチオニンをコードする。また、該リンカーは元の配列には存在していなかったSpeI制限部位を含んでいた。標準的な方法を用い、該リンカーデュプレックスをpAMG21-huOPG-22-401におけるXbaIおよびKpnI部位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を形質転換によってイー・コリ宿主GM221に導入した。クローンをまず組換え蛋白質の産生につきスクリーニングした。プラスミドDNAを陽性クローンから単離し、DNA配列決定を行って、HuOPG-Met [22-401] (P25A) 遺伝子のDNA配列を確認した。以下のオリゴヌクレオチドを用いてXbaI-KpnIリンカーを生成させた。

オリゴ #1289-84

5'-CTA GAA GGA GGA ATA ACA TAT GGA AAC TTT TGC TCC
AAA ATA TCT TCA TTA TGA TGA AGA AAC TAG TCA TCA GCT GCT
GTG TGA TAA ATG TCC GCC GGG TAC -3' (配列番号: 115)

オリゴ #1289-85

5'- CCG GCG GAC ATT TAT CAC ACA GCA GCT GAT GAC TAG
TTT CTT CAT CAT AAT GAA GAT ATT TTG GAG CAA AAG TTT CCA
TAT GTT ATT CCT CCT T-3' (配列番号: 116)

X. ヒトOPG met [22-401] (P26A) および (P26D)

原核生物発現ベクター pAMG21 中の lux P_R プロモーターの制御下にある、N-末端メチオニンおよび26位のプロリンがアラニンによって置換されたヒトOPGのアミノ酸22ないし401をコードするDNA配列を以下のごとくに構築した。合成オリゴ#1289-86および1289-87をアニールして、XbaIおよびSpeI粘着末端を持つオリゴリンカーデュプレックスを形成させた。合成リンカーデュプレックスは最適なイー・コリのコドンを利用し、N-末端メチオニンをコードした。標準的な方法を用い、該リンカーデュプレックスをpAMG21-huOPG [22-401] におけるXbaIおよびSpeI部位の間に方向付けて挿入した。連結混合物を形質転換によってイー・コリ宿主GM221に導入した。

クローンをまず組換え蛋白質の産生につきスクリーニングした。プラスミドDNAを陽性クローンから単離し、DNA配列決定を行って、huOPG-met [22-401] (P26A) 遺伝子のDNA配列を確認した。配列決定したクローンのうちの1つは、26位のプロリンがアラニンではなくむしろアスパラギン酸によって置換されていることが判明し、このクローンをhuOPG-met [22-401] (P26D) と命名した。以下のオリゴヌクレオチドを用いてXbaI-SpeIリンカーを生成させた。

オリゴ #1289-86

5' - CTA GAA GGA GGA ATA ACA TAT GGA AAC TTT TCC
TGC TAA ATA TCT TCA TTA TGA TGA AGA AA - 3'
(配列番号: 117)

オリゴ #1289-87

5' - CTA GTT TCT TCA TCA TAA TGA AGA TAT TTA GCA
GGA AAA GTT TCC ATA TGT TAT TCC TCC TT - 3'
(配列番号: 118)

Y. ヒトOPG met [22-194] (P25A)

原核生物発現ベクター pAMG21 中の lux P_R プロモーターの制御下に

ある、N-末端メチオニンおよび25位のプ

ロリンがアラニンによって置換されたヒトOPGのアミノ酸22ないし194につきコードするDNA配列を以下のごとくに構築した。プラスミドpAMG21-huOPG[27-194]およびpAMG21-huOPG[22-401](P25A)を、各々、KpnIおよびBamHIエンドヌクレアーゼで消化した。450bp断片をpAMG21-[27-401]から単離し、6.1kb断片をpAMG21-huOPG[22-401](P25A)から単離した。これらの断片を一緒に連結し、形質転換によってイー・コリ宿主GM221に導入した。クローンをまず組換え蛋白質の産生につきスクリーニングした。プラスミドDNAを陽性クローンから単離し、DNA配列決定を行って、huOPG-Met[22-194](P25A)遺伝子のDNA配列を確認した。

実施例9

OPGモノマーの会合

muOPG[22-401]を過剰発現するように設計されたCHO細胞を用いて、ウサギ抗-OPGポリクローナル抗体を用い、分泌された組換えOPGの分析用の馴化培地を得た。馴化培地のアリコットを20-倍濃縮し、次いで、還元性およ

び非還元性SDS-PAGEによって分析した(図15)。還元性条件下では、蛋白質は、成熟蛋白質がその1以上のコンセンサスN-結合糖鎖付加部位において糖鎖付加されているであろう予測されるがごとくに、Mr50-55kdポリペプチドとして移動した。驚くべきことに、同試料を非還元性SDS-PAGEによって分析すると、大部分の蛋白質はほぼ100kdポリペプチド(還元された蛋白質のサイズの2倍)として移動した。加えて、少量のMr50-55kdポリペプチドがあった。SDS-PAGEでの移動のこのパターンは、OPG産物は遊離スルフヒドリル基の酸化を介してダイマーを形成しているという認識と合致した。

予測された成熟OPGポリペプチドは23個のシステイン残基を含み、そのう

ち18個が、4つのシステイン-リッチのドメインよりなる鎖内ジスルフィド架橋の形成に関与すると予測された(図12A)。5つの残りのC-末端システイン残基は、他のTNRFファミリーメンバーとの相同性に基づいて予測できる第2次構造に関与しない。総じて、正味の一様でない数のシステイン残基があり、形式的には、少なくとも1つの残基は遊離していて、2つのOPGモノマーの間で分子間ジスルフィ

ド結合を形成する可能性がある。

OPG動性およびモノマー会合のパターンの解明を助けるために、パルス-追跡標識実験を行った。³⁵Sメチオニンおよびシステインを含有する無血清培地中、muOPG[22-401]を発現するCHO細胞を前記したごとく30分間代謝的に標識した。この時間の後、培地を取り出し、未標識メチオニンおよびシステインを放射性アミノ酸の元の濃度に対してほぼ2,000-倍過剰のレベルにて含有する完全培地で取り替えた。添加後30分、1時間、2時間、4時間、6時間および12時間において、馴化培地を取り出して培養物を収穫し、馴化培地の溶解物および接着性単層を調製した。培地および細胞溶解物を前記したごとくに清澄化し、次いで、前記したごとくに抗-OPG抗体を用いて免疫沈降させた。免疫沈降物を洗浄した後、非還元性SDS-PAGE緩衝液中で沸騰させることによってそれらを遊離させ、次いで2つの等しい半分物に分けた。1つの半分物に還元剤β-メルカプトエタノールを5%(v/v)最終濃度まで添加し、他方、他の半分物を非還元性条件に維持した。両セットの免疫沈降物を前記したごとくにSDS-PAGEによって分析し、次いで、オートラジオグラフィー用

に加工し、フィルムに暴露した。結果を図16に示す。還元性SDS-PAGEによって分析した試料を底部の2つのパネルに示す。合成の後、OPGポリペプチドをわずかにより大きいポリペプチド(これは、恐らくはN-結合糖鎖付加による修飾を表す)へと迅速に加工処理された。ほぼ1-2時間後、細胞中のOPGのレベルは劇的に低下し、同時に培養上清に出現する。これは経時的な細胞から培地へのOPGの定方向的輸送の結果であると考えられ、OPGが天然では分

泌蛋白質であるという認識と合致する。非還元条件下での同免疫沈降物の分析により、OPGダイマーの形成と馴化培地への分泌との間の関係がわかる（図16、上方パネル）。最初の30-60分において、OPGモノマーは、明らかな糖鎖付加によって細胞中で加工され、続いてダイマーが形成される。時間が経つと、大量のOPGモノマーがダイマーへと誘導され、これは引き続いて細胞から消失する。合成後約60分から始まり、OPGダイマーが馴化培地に出現し、実験の継続中にわたって蓄積する。この時期の後、OPGダイマーが形成され、これは次いで培養培地中に分泌される。全経過でOPGモノマーは細胞内で低レベルのままでおり、また、少量が培地中に出現する。これは共有結

合OPGの分解の結果のようには見えず、むしろ、細胞中での化学量的の量のモノマーの産生および引き続いての分泌の結果のようである。

トランスフェクトされたCHO細胞から組換えにより産生されたOPGは圧倒的にダイマーのようである。二量体化がOPG合成における天然のプロセスであるか否かを判断するために、本発明者らは、天然でOPGを発現することが見出されている細胞系の馴化培地を分析した。CTL-2細胞、ネズミ細胞傷害性Tリンパ球細胞系（ATCC受託番号TIB-214）は組織および細胞系RNAのスクリーニングにおいてOPG mRNAを発現することが判明した。OPG転写体は腎臓から同定されたクローン化され配列決定された2.5-3.0 kb RNAと同一であることが判明し、また、分泌される分子をコードすることが判明した。CTL-2細胞から得られた馴化培地のウェスタンブロット分析は、全てではないにせよ、分析されたOPG蛋白質のほとんどはダイマーであることを示す（図17）。これはOPGの二量体化および分泌が細胞系における過剰発現の人工的なものではなく、発現細胞によってそれが産生されるごとく、産物の主要な形態であるらしいことを

示唆する。

正常およびトランスジェニックマウスの組織および血清を分析して、OPGトランスジェニックマウスで発現されたOPG分子の性質を決定した。ラットOP

G₁cDNAは肝細胞制御エレメントの制御下で発現されたので、非還元性条件下で対照およびトランスジェニックマウスの異常発育組織から作成された抽出物を分析した(図18)。対照マウスからではなくトランスジェニックマウスからの抽出物において、化学量論的量のモノマーと共にOPGダイマーが容易に検出される。OPGダイマーおよびモノマーは遺伝子工学により作成されたCHO細胞で発現された組換えネズミ蛋白質と同一のようである。これは、OPGダイマーが、事実、遺伝子産物の天然形態であって、鍵となる活性成分であることを強く示唆する。対照およびトランスジェニックマウスから得られた血清試料を同様にウェスタンブロット分析によって分析した。対照マウスにおいて、大部分のOPG蛋白質はダイマーとして移動し、他方、少量のモノマーも検出される。加えて、有意量のより大きいOPG関連蛋白質が検出され、これは共有結合トリマーの予測されるサイズと一致する相対的分子量にて移動する。かくして、組換えOP

GはOPGトランスジェニックマウスにおいて、圧倒的にダイマー蛋白質として発現され、ダイマー形態はOPGマウスにおける大理石骨病表現型に対する基礎となるであろう。また、OPG組換え蛋白質はより高分子量の「トリマー」形態でも存在し得る。

OPGの5つのC-末端システイン残基がホモダイマー化において役割を演じるか否かを判断するために、前記したQuickChangeTM部位特異的突然変異誘発キット(Stratagene, San Diego, CA)を用い、システイン残基195(C195)、C202、C277、C319、およびC400に対するネズミOPGコドン进行セリンに変化させた。muOPG遺伝子をpcDNA3.1(+)ベクター(Invitrogen, San Diego, CA)のNotIおよびXbaI部位の間にサブクローンした。得られたプラスミド、pcDNA3.1-muOPG、および突然変異原性プライマーをデオキシヌクレオチドの存在下でPfuポリメラーゼで処理し、次いで、前記したごとくサーモサクラで増幅した。次いで、反応のアリコットを熱ショックによってコンピテント・イー・コリXL1-Blueにトランスフェク

トし、次いで、平板培養した。次いで、トランスフェクタントからのプラスミド DNA を配列決定して突然変異を確認した。

以下のプライマー対を用いて、ネズミ O P G 遺伝子のコドンをしステイン残基 195 からセリンに変化させ、その結果、m u O P G [22-401] C195 S 蛋白質が産生した。

1389-19:

5' -CAC GCA AAA GTC GGG AAT AGA TGT CAC-3'
(配列番号: 150)

1406-38:

5' -GTG ACA TCT ATT CCC GAC TTT TGC GTG-3'
(配列番号: 151)

以下のプライマー対を用いて、ネズミ O P G 遺伝子のコドンをしステイン残基 202 からセリンに変化させ、m u O P G [22-401] C202 S 蛋白質が産生した。

1389-21:

5' -CAC CCT GTC GGA AGA GGC CTT CTT C-3'
(配列番号: 152)

1389-22:

5' -GAA GAA GGC CTC TTC CGA CAG GGT G-3' (1389-22)
(配列番号: 153)

以下のプライマー対を用いて、ネズミ O P G 遺伝子のコドンをしステイン残基 277 からセリンに変化させ、m u O P G [22-401] C277 S 蛋白質が産生した。

1389-23:

5' -TGA CCT CTC GGA AAG CAG CGT GCA-3'
(配列番号: 154)

1389-24:

5' -TGC ACG CTG CTT TCC GAG AGG TCA-3'
(配列番号: 155)

以下のプライマー対を用いて、ネズミOPG遺伝子のコドンシステイン残基319からセリンに変化させ、muOPG [22-401] C319S蛋白質が産生した。

1389-17:

5' -CCT CGA AAT CGA GCG AGC AGC TCC-3'

(配列番号: 156)

1389-18:

5' -CGA TTT CGA GGT CTT TCT CGT TCT C-3'

(配列番号: 157)

以下のプライマー対を用いて、ネズミOPG遺伝子のコドンシステイン残基400からセリンに変化させ、muOPG [2

2-401] C400S蛋白質が産生した。

1406-72:

5' -CCG TGA AAA TAA GCT CGT TAT AAC TAG GAA TGG-3'

(配列番号: 158)

1406-75:

5' -CCA TTC CTA GTT ATA ACG AGC TTA TTT TCA CGG-3'

(配列番号: 159)

次いで、適当な突然変異を含有する各得られたmuOPG [22-401] プラスミドをヒト293細胞にトランスフェクトし、突然変異体OPG-Fc融合蛋白質を前記したごとくに馴化培地から精製した。各蛋白質の生物学的活性を実施例11に記載したごとくにイン・ビトロ破骨細胞形成アッセイで評価した。各トランスフェクタントからの馴化培地を非還元性SDS-PAGEおよび抗OPG抗体を用いるウェスタンブロッティングによって分析した。

5つのC-末端システイン残基のいずれの突然変異も、その結果、圧倒的な(>90%)モノマー55kdOPG分子の産生となった。これは、C-末端システイン残基が一緒になってOPGホモダイマー化で役割を演じていることを強く示唆する。

OPGホモダイマー化に重要なOPG C-末端ドメインの領域をマップするために、C-末端OPG欠失突然変異体を構築した。これらのOPG突然変異体は、未成熟停止翻訳シグナルをネズミOPGのC-末端領域に導入するプライマーを用い、PCR増幅によって構築した。5'オリゴはMuOPG開始コドン（HindIII制限部位）に対して設計し、3'オリゴヌクレオチド（停止コドンおよびXhoI部位を含有）は、トレオニン残基200（CT200）、プロリン212（CT212）、グルタミン酸293（CT-209）、またはセリン355（CT-355）いずれかにおいて終わるmuOPGのC-末端領域切形（truncate）となるように設計した。

以下のプライマーを用いて、muOPGi [22-200] を構築した。

1091-39:

5' -CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA
AG-3'（配列番号：160）

1391-91:

5' -CCT CTC TCG AGT CAG GTG ACA TCT ATT CCA CAC TTT
TGC GTG GC-3'（1391-91）（配列番号：161）

以下のプライマーを用いて、muOPG [22-212] を

構築した。

1091-39:

5' -CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA
AG-3'（配列番号：162）

1391-90:

5' -CCT CTC TCG AGT CAA GGA ACA GCA AAC CTG AAG AAG
GC -3'（配列番号：163）

以下のプライマーを用いて、muOPG [22-293] を構築した。

1091-39:

5' -CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA

AG-3' (配列番号: 164)

1391-89:

5' - CCT CTC TCG AGT CAC TCT GTG GTG AGG TTC GAG TGG

CC-3' (配列番号: 165)

以下のプライマーを用いて、muOPG [22-355] を構築した。

1091-39:

5' -CCT CTG AGC TCA AGC TTC CGA GGA CCA CAA TGA ACA

AG-3' (配列番号: 166)

1391-88:

5' CCT CTC TCG AGT CAG GAT GTT TTC AAG TGC TTG AGG GC-3'

(配列番号: 167)

次いで、適切な切形を含有する各得られたmuOPG-CTプラスミドをヒト293細胞にトランスフェクトし、突然変異体OPG-Fc融合蛋白質を前記したごとくに馴化培地から精製した。各蛋白質の生物学的活性を実施例11に記載したイン・ビトロ破骨細胞形成アッセイで評価した。また、非還元性SDS-PAGEおよび抗-OPG抗体を用いるウェスタンブロッティングによって馴化培地を分析した。

OPGのC-末端領域の切形 (truncation) はホモダイマーを形成するOPGの能力に影響する。CT355は圧倒的にモノマーであるが、いくらかのダイマーが形成される。CT293は等モル量のモノマーおよびダイマーであるように見えるものを形成し、また、高分子量が集合する。しかしながら、CT212およびCT200はモノマーである。

実施例10

OPGの精製

A. 哺乳動物OPG-Fc融合蛋白質の精製

OPG-Fc融合蛋白質を発現する293細胞からの馴化培地5Lを以下のごとくに調製した。細胞の凍結試料を10mlの293S培地 (DMEM-高グル

コース、 $1 \times L$ -グルタミ

ン、10%加熱不活化胎児ウシ血清 (FAB) および $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ヒグロマイシン) に解凍し、1日後に新鮮な培地を供給した。3日後、細胞を1:10および1:20希釈にて、2つのT175フラスコに分けた。2つのさらなる1:10分割を行って、200のT175フラスコにスケールアップした。細胞はこの時点で解凍の5日後であった。細胞をほとんど密集まで増殖させ(約3日)、その時点で血清含有培地を吸引し、細胞をフラスコ当たり25mlのPBSで1回洗浄し、25mlのSF培地(DMEM-高グルコース、 $1 \times L$ -グルタミン)を各フラスコに添加した。細胞を3日間、5%CO₂中に維持し、その時点で培地を収穫し、遠心し、0.25m硝酸セルロースフィルター(Corning)を通して濾過した。

PBS中で平衡化させたプロテインG Sepharoseカラム(Pharmacia)を用い、OPG-Fc融合蛋白質を精製した。カラムサイズは出発培地の容量に応じて変化させた。前記したごとくに調製した馴化培地を該カラムに負荷し、カラムをPBSで洗浄し、100mMグリシン、pH2.7を用いて純粋な蛋白質を溶出させた。1MトリスpH9.2を含有する試験管に画分を収集して、出来る限り素早く中和した。

蛋白質含有画分をプールし、Amicon CentriconまたはCentrprep10いずれかで濃縮し、PBSに透析濾過した。純粋な蛋白質を-80℃で保存した。

ネズミ[22-401]-Fc、ネズミ[22-180]-Fc、ネズミ[22-194]-Fc、ヒト[22-401]-Fcおよびヒト[22-201]-Fcをこの手法によって精製した。ネズミ[22-185]-Fcはこの手法によって精製される。

B. 抗-OPG抗体の調製

3匹のNew Zealand Whiteウサギ(初期体重5-8 lbs)にmuOPG[22-401]-Fc融合蛋白質を皮下注射した。等容量のフ

ロイントの完全アジュバント中に乳化した 50μ 抗原で各ウサギを第1日に免疫化した。フロイントの不完全アジュバントで置き換えて、同一手法によって、さらにブースト（第14日および28日）注射を行った。抗体の力価をEIAによってモニターした。第2ブーストの後、抗血清は高抗体力価を示し、25mlの生じた血液を各動物から得た。該血清を、まず、ネズミOPG-Fcを固定化したアフィニティーカラムに通した。抗-OPG抗体を、1%水酢酸

を含有するPierce温和溶出緩衝液（Gentle Elution Buffer）で溶出させた。次いで、溶出した蛋白質をPBSに透析し、Fcカラムに通して、OPG融合蛋白質のFc部分に対して特異的ないずれの抗体も除去した。抗-OPG特異的抗体を含有する画分を通じての実験物をPBSに透析した。

C. ネズミOPG [22-401] の精製

抗体アフィニティークロマトグラフィー

アフィニティー精製した抗-OPG抗体をカップリング緩衝液（0.1M炭酸ナトリウム、pH8.3、0.5M NaCl）に透析濾過し、室温にて2時間、CNBr-活性化セファロースビーズ（Pharmacia）と混合した。次いで、1Mエタノールアミン（pH8.0）で未カップリング部位をブロックする前に、室温にて樹脂をカップリング緩衝液で十分に2時間洗浄した。次いで、樹脂を低pH（0.1M酢酸ナトリウム、pH4.0、0.5M NaCl）、続いて高pH洗液（0.1M トリス-HCl、pH8.0）0.5M NaClで洗浄した。最後の洗浄を3回反復した。カラムに充填する前に、樹脂を最後にPBSで平衡化させた。充填後一度、樹脂をPBSで洗浄した。0.1M グリシン-HCl（pH2.5）でブランク溶出を行い、続いてPBSで再平衡化させた。

脂をPBSで洗浄した。0.1M グリシン-HCl（pH2.5）でブランク溶出を行い、続いてPBSで再平衡化させた。

muOPG [22-410] を発現するCHO細胞からの濃縮された馴化培地を低流速でカラムに適用した。280nmで測定したUV吸収がベースラインに復帰するまでカラムをPBSで洗浄した。蛋白質をまず0.1Mグリシン-HC

1 (pH 2.5) でカラムから溶出させ、PBSで再平衡化させ、第2緩衝液 (0.1M CAPS、pH 10.5、1M NaCl) で溶出させた。2回の溶出プールを別々にPBSに透析濾過し、-20℃で凍結する前に滅菌濾過した。

通常のクロマトグラフィー

CHO細胞馴化培地をAmiconラセン巻カートリッジ (S10Y10) にて23×に濃縮し、20mMトリス pH 8.0に透析濾過した。次いで、透析濾過した培地を、20mMトリス pH 8.0で平衡化してあるQ-セファローズH (Pharmacia) カラムに適用した。次いで、カラムを280nmにおける吸収がベースラインに到達するまで洗浄した。蛋白質を20カラム容量のトリス pH 8.0中の0-300mM NaClグラジエントで溶出させた。カラム画分のウェスタン

プロットを用いてOPG蛋白質を検出した。

OPGを含有する画分をプールし、300mM NaCl、0.2mM DTTの最終濃度に持って行った。NiNTAスーパーローズ (Qiagen) カラムを20mMトリス pH 8.0、300mM NaCl、0.2mM DTTで平衡化させ、しかる後、プールして画分を適用した。ベースライン吸収に到達するまで、カラムを平衡化緩衝液で洗浄した。平衡化緩衝液中の0-30mM イミダゾールグラジエントで蛋白質をカラムから溶出させた。残存する蛋白質を1M イミダゾールでカラムから洗い出した。再度、ウェスタンプロットを用いてOPG含有画分を検出した。

NiNTAカラムからのプールした画分を10mM リン酸カリウム pH 7.0、0.2mM DTTに透析した。次いで、透析したプールを、10mM リン酸緩衝液で平衡化させてあるセラミックヒドロキシアパタイトカラム (Bio-Rad) に適用した。カラム洗浄の後、20カラム容量にわたって10-100mM リン酸カリウムグラジエントで蛋白質を溶出させた。これに続いて、20カラム容量の100-400mM リン酸塩のグラジエントを行った。

SDS-ポリアクリルアミドゲルのクーマシーブルー染色によっておよびウエ

スタンプロッチングによってOPGを検出した。画分をプールし、PBSに透析濾過し、 -80°C で凍結させた。精製した蛋白質はモノマーとして泳動し、PBSへの透析濾過後でもそのままであろう。モノマーは 4°C でpH5にて凍結保存した場合にも安定である。しかしながら、もしPBS中、 4°C で保存すると、ダイマーならびにトリマーおよびテトラマーであるらしいものが1週間後に形成されるであろう。

D. イー・コリからのヒトOPG met [22-401] の精製

5°C にて低剪断ホモゲナイザーを用い、細菌細胞ペーストを15% (w/v) の濃度になるように10mM EDTAに懸濁させた。次いで、各 5°C で15,000psiにての2回のホモゲナイズ化によって細胞を破壊した。得られたホモゲネートを 5°C にて5,000×gで1時間遠心した。遠心ペレットを、元のホモゲナイズ化容量の水への低剪断ホモゲナイズ化によって洗浄し、続いて前記したごとくに遠心した。次いで、雰囲気温度にて、洗浄したペレットを、6M塩酸グアニジン、10mMジチオスレイトール、10mM トリスHCl、pH8

5の溶液（最終濃度）によって15% (w/v) まで30分間で可溶化した。この溶液を、50mM CAPS、pH10.5、1mM還元型グルタチオンを含有する2M尿素に30倍希釈し、次いで、 5°C で72時間攪拌した。まず酢酸でpH4.5に調整し、次いで25mM酢酸ナトリウム、pH4.5で平衡化させたSP-HP Sepharose樹脂のカラムでのクロマトグラフィーに付すことによってOPGを 25°C でこの溶液から精製した。カラム溶出は、0.1カラム容量/分の流速にて20カラム容量を用い、同緩衝液中50mMないし550mMの塩化ナトリウムの直線グラジエントで行った。所望のOPG形態のみを含有するピーク画分をプールし、 5°C で保存するか、あるいは緩衝液をリン酸緩衝化生理食塩水に交換し、限外濾過によって濃縮し、次いで 5°C で保存した。この物質を、逆相HPLC、SDS-PAGE、エンドトキシンの存在についてのカプトガニ遊走細胞溶解物アッセイ、およびN-末端配列決定によって分析した。加えて、質量分析、pH/温度安定性、蛍光、円二色性、示差走査熱分析、およ

びプロテアーゼプロフィリングアッセイのごとき技術を用いて蛋白質の折り畳まれた特性を調べることもできる。

実施例 11

組換え OPG の生物学的活性

組織学および組織形態学に基づくと、トランスジェニックマウスにおける OPG の肝臓での過剰発現は破骨細胞の数を顕著に減少させ、骨組織の顕著な増加に至るようであった（実施例 4 参照）。このイン・ビボ効果の基礎となる可能なメカニズムへのさらなる洞察を得るために、種々の形態の組換え OPG を、破骨細胞形成のイン・ビトロ培養モデル（破骨細胞形成アッセイ）でテストした。この培養系は元々 Udagawa (Usagawa ら, *Endocrinology* 125, 1805-1813 (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7260-7264 (1990)) によって考案されたもので、骨髓細胞および骨髓支質細胞系からの細胞の組合せを使用する。これらの実験で使った培養系の修飾の記載は従前に公開されている (Lacey ら, *Endocrinology* 136, 2367-2376 (1995))。この方法においては、マウスから的大腿骨および脛骨から満たした骨髓細胞を、500 U/ml CSF-1 (コロニー刺激因子 1、M-CSF と呼ばれる)、単球/マクロファージフ

ァミリー系統の細胞に対して特異的な造血成長因子を補足した、培養培地 (10% の加熱不活化胎児ウシ血清を含むアルファ MEM) 中で一晚培養する。このインキュベーションに続き、非接着性細胞を収集し、グラジエント精製に付し、次いで、骨髓細胞系 ST2 からの細胞と共培養する (1×10^6 非接着性細胞 : 1×10^5 ST2 細胞/ml 培地)。デキサメタゾン (100 nM) および 1, 25 ジヒドロキシビタミン D3 としても知られているビタミン D3 の生物学的に活性な代謝産物 (1, 25 (OH)₂D3, 10 nM) を培地に補足する。破骨細胞の出現を増強するために、プロスタグランジン E2 (250 nM) をいくつかの培養に添加する。共培養期間は通常 8-10 日の範囲であり、新たに添加した

全ての補足物と共に培地を3-4日毎に新しくする。種々の間隔で、組織化学染色 (Sigma キット番号387A, Sigma, St. Louis, MO) またはTRAP溶液アッセイいずれかを用い、培養を、酒石酸酸性ホスファターゼ (TRAP) の存在につき評価する。このTRAP組織化学方法により、TRAP+であり多核化された (≥ 3 核) 細胞である破骨細胞の表現型を同定できる。溶液アッセイは、0.1%トリトンX-100を含有する

クエン酸緩衝液 (100 mM、pH 5.0) 中で破骨細胞含有培養物を溶解することを含む。次いで、室温で3-5分間のインキュベーションの間に起こる、80 mM酒石酸ナトリウムの存在下におけるp-ニトロフェニルホスフェート (20 nM) からp-ニトロフェノールへの変換に基づいて、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性を測定する。0.5 Mの最終濃度までNaOHを添加することによって反応を終了させる。405 nmにおける光学密度を測定し、結果をプロットする。

破骨細胞形成アッセイを用いる従前の研究 (Udagawaら, 前掲) は、これらの細胞は、 125 I-カルシトニン (オートラジオグラフィ) に対する受容体を発現し、骨表面に小窩を作ることができ、これをTRAP陽性性と組み合わせると、多核化細胞は破骨細胞表現型を有することが確認されることを、示している。破骨細胞形成アッセイにおいてイン・ビトロで生起する多核化細胞の破骨細胞表現型を支持するさらなる証拠は、免疫組織化学法により α vおよび β 3インテグリンをならびにイン・サイチュ・ハイブリダイゼーション (ISH) によりカルシトニン受容体およびTRAP mRNAを発現するということである。

huOPG [22-401]-Fc融合をCHO細胞馴化培地から精製し、引き続き破骨細胞形成アッセイに用いた。huOPG [22-401]-Fcの100 ng/mlで、破骨細胞形成は実質的に100%阻害された (図19A)。マイクロタイタープレートウェル中の溶解した培養物で測定されたTRAPのレベルもOPGの存在下で阻害され、ID₅₀はほぼ3 ng/mlであった (図20)。溶解物におけるTRAP活性のレベルはTRAP細胞化学法によって観察

された破骨細胞の相対数と相関しているようであった（図19A-19Gおよび20を比較されたし）。また、精製されたヒトIgG1およびTNF β は、このモデルでテストしたところ、阻害もしくは刺激効果を有しないことが判明し、huOPG [22-401]-Fcの阻害効果は融合蛋白質のOPG部分によるものであることが示唆された。さらなる形態のヒトおよびネズミ分子をテストし、蓄積されたデータを表1にまとめる。

表 1

イン・ビトロ破骨細胞形成に対する種々の O P G 形態の効果

O P G 構築体	イン・ビトロにおける相対的生物活性
muOPG[22-401]-Fc	+++
muOPG[22-194]-Fc	+++
muOPG[22-185]-Fc	++
muOPG[22-180]-Fc	-
muOPG[22-401]	+++
muOPG[22-401]C195	+++
muOPG[22-401]C202	+
muOPG[22-401]C277	-
muOPG[22-401]C319	+
muOPG[22-401]C400	+
muOPG[22-185]	-
muOPG[22-194]	++
muOPG[22-200]	++
muOPG[22-212]	-
muOPG[22-293]	+++
muOPG[22-355]	+++
huOPG[22-401]-Fc	+++
huOPG[22-201]-Fc	+++
huOPG[22-401]-Fc P26A	+++
huOPG[22-401]-Fc Y28F	+++
huOPG[22-401]	+++
huOPG[27-401]-Fc	++
huOPG[29-401]-Fc	++
huOPG[32-401]-Fc	+/-
+++ , ED ₅₀ = 0.4-2 ng/ml	
++ , ED ₅₀ = 2-10 ng/ml	
+ , ED ₅₀ = 10-100 ng/ml	
- , ED ₅₀ > 100 ng/ml	

蓄積されたデータは、Fcドメインに融合させた場合または融合させなかった場合、ネズミおよびヒトOPGアミノ酸配列22-401はイン・ビトロで十分活性であることを示す。それらは用量依存的に阻害し、2-10 ng/ml範囲

の半最大活性を保有する。トレオニン残基180におけるネズミC-末端の切形は分子を不活化させ、他方、システイン185におけるおよびそれを越えての切形は十分な活性を有する。185位に位置するシステイン残基はOPGのドメイン4領域においてSS3結合を形成すると予測される。他のTNRF-関連蛋白質におけるこの残基の除去は、生物学的活性を阻害することが従前に示されている(Yanら, J. Biol. Chem. 266, 12099-12104 (1994))。muOPG[22-180]-Fcは不活性であるが、muOPG[22-185]-Fcは活性であるとする1つの知見は、これらの知見と一致する。これは、アミノ酸残基22-185はOPG活性についての領域を規定することを示唆する。

これらの知見は、トランスジェニカルに発現されたOPGと同様に、組換えOPG蛋白質も破骨細胞形成アッセイでテストしたときに破骨細胞形成を抑制することを示す。OPGに連続

的に暴露された培養物におけるTRAP+細胞、 β 3+細胞、F480+細胞の出現を調べる経時的実験は、OPGがTRAP+および β 3+細胞の出現を阻止するが、F480+細胞の出現は阻止しないことを示す。対照的に、TRAP+および β 3+細胞は対照培養において培養樹立後4日のように早くに出現し始める。F480+細胞のみがOPG-処理培養で見い出すことができ、それは質的に対照培養と同数で存在するようである。かくして、イン・ビトロにおけるOPG効果のメカニズムは、単球-マクロファージの出現以後TRAPもしくは β 3インテグリンいずれかを発現する細胞の出現以前において、破骨細胞分化の阻止を含むようである。総括的に、これらの知見は、OPGが骨髄からの単球-マクロファージ前駆体の一般的増殖および分化に干渉しなく、むしろ単球-マクロファージ前駆体からの破骨細胞の選択的分化を特異的に阻止することを、示唆する。

破骨細胞分化経路においていつOPGが阻害的であるかをより厳密に決定するために、イン・ビトロ培養方法の変形法を用いた。Laceyら(前掲)に記載されているこの変形法は破骨細胞前駆体として骨髄マクロファージを使用する。

CSF-

1/M-CSF中で一晩インキュベーションを行った後、非接着性骨髄細胞を採取し、1,000~2,000 U/ml CSF-1にてさらに4日間細胞を培養することによって破骨細胞前駆体を誘導する。増殖相と呼ばれる4日の培養の後、非接着細胞を除去する。次いで、骨髄マクロファージである接着性細胞を、2日までの間、1,000~2,000 U/ml CSF-1の存在下で、種々の処理に暴露することができる。この2日の期間は中間分化期間と呼ばれる。しかる後、細胞溶解物を再度すすぎ、次いで、終末分化期間と呼ばれる最後の8日間に、ST-2細胞 (1×10^5 細胞/ml)、デキサメタゾン (100 nM) および $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10 nM) を添加する。テスト剤を同様にこの終末期間に添加することができる。破骨細胞の表現型マーカーの獲得がその終末期間の間に獲得される (Laceyら, 前掲)。

huOPG [22-401]-Fc (100 ng/ml) を、それを中間、終末期間いずれか、あるいは別法として両分化期間に添加することによって、このモデルにおける破骨細胞形成に対する効果につきテストした。TRAP細胞化学法および溶液アッセイ双方を行った。溶液アッセイの結果を図21に示す。

huOPG [22-401]-Fcは、中間および終末双方、または終末分化相のみに添加した場合に、TRAP活性の出現を阻害した。中間相に添加し、次いですすぐことによって培養から除去した場合には、huOPG [22-401]-Fcは培養溶解物においてTRAP活性の出現を阻止しなかった。細胞化学法の結果は溶液アッセイデータと足並みをそろえている。総括的には、これらの観察は、huOPG [22-401]-Fcに破骨細胞形成への抑制効果の全てを発揮させるには、終末分化期間に存在させる必要があるのみであることを示す。

B. イン・ビボIL1- α およびIL1- β 攻撃(challenge)実験

IL1は、マウスの頭蓋冠に皮下注射すると、全身적および局所的双方にて骨吸収を増大させる (Boyceら, *Endocrinology* 125, 1142-1150 (1989))。全身効果は、高カルシウム血症の程度によって

評価でき、局所的効果は破骨細胞-媒介応答の相対的大きさを評価することによって組織学的に評価できる。これらの実験の目的は、組換えmuOPG [22-401]-Fcが、IL1と同一の頭蓋冠領域に皮下注射された場合にIL1の局所および/また

は全身作用を修飾できるか否かを判断することにある。

IL-1 β 実験

4週齢の雄マウス(ICR Swiss white)を以下の処理群(群当たり5匹のマウス):対照群:IL1処理動物(マウスは2.5 μ gのIL1- β の1注射/日を与えた);低用量muOPG [22-401]-Fc処理動物(マウスは1 μ gのmuOPG [22-401]-Fcの3注射/日を与えた);低用量muOPG [22-401]-FcおよびIL1- β ;高用量muOPG [22-401]-Fc処理動物(マウスは10 μ g muOPG [22-401]-Fcの3注射/日を与えた);高用量muOPG [22-401]-FcおよびIL1- β に分けた。全てのマウスに活性因子またはビヒクル(リン酸緩衝化生理食塩水中0.1%ウシ血清アルブミン)の同一合計数の注射を与えた。最後の注射後の日に全群を犠牲にする。最初の注射の前、第2の注射の4時間後、および第3のIL1注射の24時間後、動物を犠牲にする直前に体重および血中イオン化カルシウムレベルを測定する。犠牲にした後、頭蓋冠を摘出し、パラフィン切片化のために加工した。

IL1- α 実験

4週齢の雄マウス(ICR Swiss white)を以下の処理群(群当たり5匹のマウス):対照群:IL1アルファ処理動物(マウスは5 μ gのIL1- α の1注射/日を与えた);低用量muOPG [22-401]-Fc処理動物(マウスは10 μ gのmuOPG [22-401]-Fcの1注射/日を与えた);低用量muOPG [22-401]-FcおよびIL1- α 、(用量は前記);高用量muOPG [22-401]-Fc処理動物(マウスは10 μ g muOPG [22-401]-Fcの3注射/日を与えた);高用

量 μOPG [22-401] -Fc および $\text{IL1-}\alpha$ に分けた。全てのマウスに活性因子またはビヒクルの同一合計数の注射／日を与えた。最後の注射後の日に全群を犠牲にした。最初の注射の前、第2の注射の4時間後、および第3の IL1 注射の24時間後、動物を犠牲にする直前に血中イオン化カルシウムレベルを測定した。最初の注射の前、第2の注射の4時間後および第3の IL1 注射の24時間後、動物を犠牲にする直前に動物の体重を測定した。犠牲にした後、頭蓋冠を摘出し、パラフィン切片化のために加工した。

組織学的方法

頭蓋冠骨試料を重鉛ホルマリン中で固定し、ギ酸中で脱灰し、エタノールにより脱水し、パラフィン中に埋めた。ラムダ縫合に隣接する頭蓋冠により切片 ($5\mu\text{m}$ 厚さ) を切断し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色するか、あるいは酒石酸耐性酸性ホスファターゼ活性につき反応させ (Sigma キット番号 387A)、ヘマトキシリンで逆染色した。最も明るいカメラを取り付けた顕微鏡を用い、デジタル化プラテンへの組織学的特徴を追跡することによつて、Osteomeasure (Osteometrics, Atlanta, GA) を用い、組織形態学的方法により $\text{IL1-}\alpha$ 処理マウスにおいて骨吸収を評価した。頭蓋冠骨の骨髓腔において、破骨細胞数、破骨細胞でライニングされた表面、および腐食された表面を測定した。頭蓋冠の注射および非注射側を別々に測定した。

結果

$\text{IL1-}\alpha$ および $\text{IL1-}\beta$ は、恐らくは、全身的骨吸収の増加によって、特に第2日において、使用した用量で高カルシウム血症を生じた。高カルシウム血症応答は $\text{IL1-}\beta$ 処理マウスにおいて μOPG [22-401] -Fc によって

阻止され、 $\text{IL1-}\alpha$ で処理したマウスでは有意に減少し、効果は第2日に最も現れた (図 22A-22B)。

$\text{IL1-}\alpha$ および β で処理したマウスの頭蓋冠の組織学的分析は、 IL1 処理単独では、破骨細胞数、破骨細胞でライニングされた表面、および腐

食された表面（破骨細胞作用のため深い波形形成を示す表面）を含めた骨吸収の指標において顕著な増加が生じた（図23B、表2）。IL1- α またはIL1- β に応答して、骨吸収の増加は頭蓋冠の注射および非注射側で同様であった。muOPG [22-401]-Fc注射は、IL1-アルファおよびベータ処理マウス双方において、およびビヒクル単独を摂取したマウスにおいて、骨吸収を低下させたが、この低下は頭蓋冠のmuOPG [22-401]-Fc注射側でのみ観察された。

これらの観察についての最もありそうな説明は、muOPG [22-401]-Fcが骨吸収を阻害したということであり、muOPG [22-401]-Fc注射側に隣接した頭蓋冠の領域において、全破骨細胞数および骨吸収を受ける利用可能な骨表面のパーセンテージ双方の低下によって支持される結論である。muOPG [22-401]-Fcの作用は組織学的方

法によって局所的に最も顕著なようであり、muOPG [22-401]-FcはIL1-誘導高カルシウム血症の効果をなくするという事実は、muOPG [22-401]-Fcが全身的な骨吸収に対してより敏感な効果を有することを示唆する。

表2 IL-1注射したマウスにおける骨吸収の変数に対するOPGの効果

	破骨細胞表面/骨表面 (平均値±S. D.)		腐食した表面/骨表面 (平均値±S. D.)		破骨細胞数/mm ² 骨表面 (平均値±S. D.)	
	非注射側	注射側	非注射側	注射側	非注射側	注射側
実験1						
対照	12.36±3.44	9.54±2.46	8.07±3.90	9.75±3.16	32.51±11.09	23.50±10.38
IL1-β(2.5μg/d)	17.18±1.30	16.40±2.16	40.66±4.28	37.53±10.28	71.80±18.76	60.89±5.16
OPG(40μg/d)	10.12±3.71	5.04±1.66	9.73±4.33	4.19±3.61	32.78±11.09	15.24±7.54
OPG+IL1-β	18.61±2.46	#13.26±2.50	44.87±8.63	#25.94±6.82	69.42±36.29	#47.13±24.26
実験2						
対照	11.56±4.22	11.95±2.97	12.67±5.04	10.03±5.13	51.72±23.93	56.03±30.70
IL1-α(5μg/d)	28.81±4.84	23.46±5.76	37.51±5.16	41.10±12.53	113.60±18.04	102.70±32.09
OPG(40μg/d)	14.40±1.00	#4.26±2.54	11.55±4.14	#4.29±3.16	72.28±14.11	#22.65±16.68
OPG+IL1-α	29.53±8.80	#17.83±3.34	33.66±9.21	#24.38±8.88	146.10±42.37	#86.56±15.62

#非注射側に対して異なる p<0.05 (対t検定)

C. muOPG [22-401] -Fcの成長するマウスにおける全身効果

9.2-15.7gの体重範囲の3-4週齢雄BDF1マウスを群当たり10

匹の群に分けた。これらのマウスに生理食塩水または $\text{muOPG} [22-401] - \text{Fc} \quad 2.5 \text{ mg/kg}$ 試行を14日間 (5 mg/kg/day) 皮下注射した。マウスを処理前、第7日および第14日にX線撮影した。最終の注射の24時間後にマウスを犠牲にした。右大腿骨を摘出し、亜鉛ホルマリン中で固定し、ギ酸中で脱灰し、パラフィンに埋めた。遠位大腿骨幹端および大腿骨幹の中央領域を通して切片を切断した。組織形態学による骨密度を、成長板の骨幹端境界から一次および二次海綿を通して大腿骨幹(幹)まで伸びる6つの隣接領域において測定した。各領域は $0.5 \times 0.5 \text{ mm}^2$ であった。

X線写真の変化

処理の7日後に、対照で観察されたそれに対してOPG処理マウスにおける成長板に関連した海綿において骨密度が増加したゾーンの証拠があった。該効果は遠位大腿骨および近位脛骨中期で特に顕著であった(図24A-24B)。しかしながら、

増加した密度のバンドは椎体、腸骨稜および遠位脛骨でも現れた。第14日において、不透明な領域が大腿骨および脛骨幹まで広がったが、X線不透過の強度は減少した。加えて、実験の完了時における大腿骨の長さにおいて、または実験の継続中にわたっての長さの変化において差異はなく、これはOPGは骨成長を変化させないことを意味する。

組織学的変化

速位大腿骨幹端は成長板からの距離 1.1 ないし 2.65 mm の距離の領域において骨密度の増加を示した(図25および26A-26B)。これは、マウスにおいて破骨細胞-媒介骨吸収によって骨が迅速に除去されている領域である。これらの迅速に成長している若いマウスにおいて、OPG処理で観察されたこの領域における骨の増加は、骨吸収の阻害と一致する。

D. ラットにおける卵巣摘出によって誘導された骨喪失に対するオステオプロテゲリンの効果

12週齢の雌Fisherラットを卵巣摘出し(OVX)、あるいは偽手術し、遠位大腿骨幹端における骨密度につきデュアルX線吸収実験(DEXA)を

行った。回復期間の3日後、動物に以下のごとくに14日間の間毎日注射した：
10匹の偽

手術動物はビヒクル（リン酸緩衝化生理食塩水）を与えた；10匹のOVX動物にはビヒクル（リン酸緩衝化生理食塩水）を与えた；6匹のOVX動物にはOPG-Fc 5mg/kgを皮下投与した；6匹のOVX動物にはパミドロネート（PAM）5mg/kgを皮下投与した；6匹のOVX動物にはエストロゲン（ESTR）40μg/kgを皮下投与した。処理の7および14日後、動物をDEXAによって骨密度を測定した。最後の注射の2日後に動物を殺し、右脛骨および大腿骨を組織学的評価のために摘出した。

骨密度のDEXA測定は、OPG-Fcによって阻止された卵巢摘出後の骨減少低下の傾向を示した。その効果は公知の抗再吸収剤のエストロゲンおよびパミドロメネートと同様であった（図27）。組織形態学的分析により、未処理OVXラットで観察されたものよりも有意に高いOVXにおける骨密度を生じるOPG-Fc処理での観察が確認された。これらの結果により、卵巢摘出後による内因性エストロゲンの中止に伴う骨喪失におけるOPGの活性が確認された。

イン・ビボの要約

組換えOPGのイン・ビボ作用はOPGトランスジェニック

マウスで観察された変化と対応する。OPGトランスジェニックマウスで観察された破骨細胞数の減少は、正常マウスおよびIL1-αまたはIL1-βで処理したマウス双方における頭蓋冠に局所的に組換えOPGを注射することによって再現された。OPGトランスジェニックマウスは、大理石骨病に罹り、誕生から第1日に向けて、骨髄は成長板から伸びる骨および再形成されていない軟骨で進行的に充填される。また、正常な第3週齢（成長する）マウスにおいて、OPG処理は、軟骨内骨形成の領域において、骨および再形成されていない軟骨の保持を導き、これはX線撮影によって観察された効果であり、組織学的に確認された。かくして、組換えOPGはトランスジェニック動物で観察されたものと同様の正常動物における表現型変化を生じ、該変化は骨吸収のOPG-誘導阻害と一

致する。破骨細胞形成のイン・ビトロアッセイに基づくと、この阻害のうちの有意な割合が損じられた破骨細胞形成によるものである。この仮説と一致して、OPGはラットにおいて卵巣摘出誘導骨粗鬆症を阻止する。このモデルにおける骨喪失は活性化された破骨細胞によって媒介されることが知られており、これは、一次骨粗鬆症の治療におけるOPGについての役割を示唆する。

実施例 12

OPGのPEG化誘導体

還元的アルキル化によるN-末端PEG-OPGコンジュゲートの調製

huOPG met [22-194] P25Aを25-50mM NaOAc、pH4.5-4.8に緩衝液交換し、2-5mg/mlまで濃縮した。この溶液を用いて、5-7℃にて単官能性PEGアルデヒドでのOPG還元的アルキル化を行った。PEG単官能性アルデヒド（線状または分岐状、MW=1ないし57kDa）（Shearwater Polymersから入手可能）を、OPG1モル当たりPEGアルデヒド2-4モルを構成する量にて、固体として、OPG溶液に添加した。蛋白質溶液へのポリマーの溶解の後、シアノ水素化ホウ素ナトリウムを添加して、冷DI水中で1-1.6Mの新たに調製したストック溶液からの反応混合物中、15ないし20mMの最終濃度とした。反応の進行およびOPG PEG化の程度は、100mM NaPO₄、0.5M NaCl、10%エタノール、pH6.9で溶出するG3000SW_{XL}カラム（Toso Haas）でのサイズ排除HPLCによってモニ

ターした。典型的には、反応を16-18時間進行させ、しかる後、反応混合物を6-8倍希釈し、pHを3.5-4まで低下させた。反応混合物を、30cm/hの流速で25カラム容量にわたる0.75M NaClまでの直線グラジエントにて20mM NaOAc pH4で溶出するイオン交換クロマトグラフィー（HP SP HiLoad 16/10、Pharmacia）によって分離した。モノー、ジマーまたはPEG化OPGの画分をプールし、SEC HPLCおよびSDS-PAGEによって性質を調べ特徴付けた。N-末端配列決定に

よって、モノPEG-OPGコンジュゲート（ほとんどの場合における主要反応生成物）は98% N-末端PEG-修飾OPGであると判断された。

この手法は、一般に、以下のN-末端PEG-OPGコンジュゲート（ここに、OPGはhuOPG met [22-194] P25Aであった）を調製するのに使用した：5 kD モノPEG、10 kD モノ分岐PEG、12 kD モノPEG、20 kD モノPEG、20 kD モノ分岐PEG、25 kD モノPEG、31 kD モノPEG、57 kD モノPEG、12 kD ジPEG、25 kD ジPEG、31 kD ジPE

G、57 kD ジPEG、25 kD トリPEG。

アシル化によるPEG-OPGコンジュゲートの調製

huOPG met [22-194] P25Aを50 mM BICINE緩衝液、pH 8に緩衝液交換し、2-3 mg/mlまで濃縮した。この溶液を用いて、室温にて、単官能性PEG N-ヒドロキシスクシニンイミジルエステルによるOPGアシル化を行った。PEG N-ヒドロキシスクシニンイミジルエステル（線状または分岐状、MW=1ないし57 kDa）（Shearwater Polymersから入手可能）を、OPG 1モル当たりPEG N-ヒドロキシスクシニンイミジルエステル4-8モルを構成する量にて、固体として、OPG溶液に添加した。反応の進行およびOPG PEG化の程度は、100 mM NaPO₄、0.5 M NaCl、10%エタノール、pH 6.9で溶出するG 3000 SW_{XL}カラム（Toso Haas）でのサイズ排除HPLCによってモニターした。典型的には、反応を1時間進行させ、しかる後、反応混合物を6-8倍希釈し、pHを3.5-4まで低下させた。反応混合物を、30 cm/hの流速で25カラム容量にわたる0.75 M NaClまでの直線グラジエントにて20 mM Na

OAc pH 4で溶出するイオン交換クロマトグラフィー（HP SP HiLoad 16/10、Pharmacia）によって分画した。モノー、ジーマまたはPEG化OPGの画分をプールし、SEC HPLCおよびSDS-PAGE

Eによって性質を調べた。

この手法は、一般に、以下のN-末端PEG-OPGコンジュゲートを調製するのに使用した：5 kD ポリPEG、20 kD ポリPEG、40 kD ポリ分岐PEG、50 kD ポリPEG。

ダイマーPEG-OPGの調製

中性に近いpHにてリン酸緩衝液中、huOPG met [22-194] P25Aを1-3 mg/mlにてチオール化のために調製する。pHを7.0に維持し、4℃で2時間rxn攪拌しつつ、S-アセチルメルカプトコハク酸無水物(AMSA)を3-7倍モル過剰で添加する。イオン交換クロマトグラフィーによってモノチオール化-OPGを未修飾およびポリチオール化OPGから分離し、保護チオールをヒドロキシルアミンでの処理によって脱保護する。脱保護の後、ヒドロキシルアミンをゲル濾過によって除去し、得られたモノチオール化-O

PGを種々のチオール特異的架橋化学法に付す。ジスルフィド結合ダイマーを生成させるために、>1 mg/mlのチオール化OPGを、わずかに塩基性のリン酸緩衝液中での透析によって空気酸化を受けさせる。pH 6.5のリン酸緩衝液中、架橋剤：OPGの0.6 x モル比にて、ビス-マレイミド架橋剤、N,N-ビス(3-マレイミドプロピアニル)-2-ヒドロキシ1,3-プロパンを>1 mg/mlのチオール化OPGと反応させることによって、共有結合チオエーテルOPGダイマーを調製する。同様に、pH 6.5のリン酸緩衝液中、化学量論的量のビス-マレイミドPEG架橋剤を>1 mg/mlのチオール化OPGと反応させることによってPEGダンベルを生成させる。前記ダイマーコンジュゲートのいずれも、イオン交換もしくはサイズ排除クロマトグラフィーいずれかを用いてさらに精製できる。

ダイマーPEG-OPGコンジュゲート（ここに、OPGは前記手法を用いて調製したhuOPG met [22-194] P25Aである）はジスルフィド結合OPGダイマー、脂肪族アミン型架橋剤との共有結合チオエーテルOPGダイマー、3.4 kDおよび8 kD PEGダンベルおよびモノベル

を含む。

実施例11Aに記載した破骨細胞成熟化アッセイを用いてイン・ビトロに活性につき、および実施例11Cに記載したごとくマウスへの注射の後に骨密度の増加を測定することによってイン・ビボ活性につき、PEG-OPGコンジュゲートをテストした。イン・ビボ活性は以下の表3に示す。

表 3
ベギュレート化されたOPGのイン・ビボ生物学的活性

OPG構築体	脛骨密度の増加
MuOPG met[22-194]	-
MuOPG met[22-194] 5k PEG	+
MuOPG met[22-185] 20k PEG	+
HuOPG met[22-194] P25A	-
HuOPG met[22-194] P25A 5k PEG	+
HuOPG met[22-194] P25A 20k PEG	+
HuOPG met[22-194] P25A 31k PEG	+
HuOPG met[22-194] P25A 57k PEG	+
HuOPG met[22-194] P25A 12k PEG	+
HuOPG met[22-194] P25A 20k 分岐 PEG	+
huOPG met[22-194] P25A 8k PEG ダイマー	+
huOPG met[22-194] P25A ジス ルフィド架橋	+

本発明を何かその好ましい具体例であるかにつき記載してきたが、本発明は開示の具体例に限定されるものではなく、その反対に、添付の請求の範囲の精神および範囲内に含まれる種々の修飾および同等物をカバーさせる意図であり、その範囲はかかる修飾および同等物を含むように最も広い解釈が容認されるべきである。

配 列 表

配列番号：1

配列の特徴

配列の長さ：36塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：1

AAAGGAAGGA AAAAAGCGGC CGCTACANNN NNNNT

36

配列番号：2

配列の特徴

配列の長さ：16塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：2

TCGACCCACG CGTCCG

16

配列番号：3

配列の特徴

配列の長さ：12塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：3

GGGTGCGCAG GC

12

配列番号：4

配列の特徴

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：4

TGTAAAACGA CGGCCAGT

18

配列番号：5

配列の特徴

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：5

CAGGAAACAG CTATGACC

18

配列番号：6

配列の特徴

配列の長さ：20塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：6

CAATTAACCC TCACTAAAGG

20

配列番号：7

配列の特徴

配列の長さ：23塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：7

GCATTATGAC CCAGAAACCG GAC

23

配列番号：8

配列の特徴

配列の長さ：23塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：8

AGGTAGCGCC CTCCTCACA TTC

23

配列番号：9

配列の特徴

配列の長さ：30塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：9

GACTAGTCCC ACAATGAACA AGTGGCTGTG

30

配列番号：10

配列の特徴

配列の長さ：45塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：1 0

ATAAGAATGC GGCCGCTAAA CTATGAAACA GCCCAGTGAC CATTC

45

配列番号：1 1

配列の特徴

配列の長さ：2 1 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：1 1

GCCTCTAGAA AGAGCTGGGA C

21

配列番号：1 2

配列の特徴

配列の長さ：21塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：12

CGCCGTGTTTCAITTTATGAGC

21

配列番号：13

配列の特徴

配列の長さ：24塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：13

ATCAAAGGCA GGGCATACTT CCTG

24

配列番号：14

配列の特徴

配列の長さ：24塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：14

GTTGCACTCC TGTTCACGG TCTG

24

配列番号：15

配列の特徴

配列の長さ：24塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：15

CAAGACACCT TGAAGGCCT GATG

24

配列番号：16

配列の特徴

配列の長さ：24塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：16

TAACCTTTTAC AGAAGAGCAT CAGC

24

配列番号：17

配列の特徴

配列の長さ：33塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：17

AGCGCGGCCG CATGAACAAG TGGCTGTGCT GCG

33

配列番号：18

配列の特徴

配列の長さ：31塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：18

AGCTCTAGAG AAACAGCCCA GTGACCATTC C

31

配列番号：19

配列の特徴

配列の長さ：24塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：19

GTGAAGCTGT GCAAGAACCT GATG

24

配列番号：20

配列の特徴

配列の長さ：24塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：20

ATCAAAGGCA GGCATACTT CCTG

24

配列番号：21

配列の特徴

配列の長さ：24塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：21

CAGATCCTGA AGCTGCTCAG TTTG

24

配列番号：22

配列の特徴

配列の長さ：33塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：22

AGCGCGGCCG CGGGGACCAC AATGAACAAG TTG

33

配列番号：23

配列の特徴

配列の長さ：33塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：23

AGCTCTAGAA TTGTGAGGAA ACAGCTCAAT GGC

33

配列番号：24

配列の特徴

配列の長さ：39塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：24

ATAGCGGCCG CTGAGCCCAA ATCTTGTGAC AAAACTCAC

39

配列番号：25

配列の特徴

配列の長さ：45塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：25

TCTAGAGTCG ACTTATCATT TACCCGAGA CAGGAGAGG CTCTT

45

配列番号：26

配列の特徴

配列の長さ：38塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：26

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG

38

配列番号：27

配列の特徴

配列の長さ：43塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：27

CCTCTGCGGC CGCTAAGCAG CTTATTTTCA CGGATTGAAC CTG

43

配列番号：28

配列の特徴

配列の長さ：38塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：28

CCTCTGAGCT CAAGCTTCG AGGACCACAA TGAACAAG

38

配列番号：29

配列の特徴

配列の長さ：24塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：29

TCCGTAAGAA ACAGCCCAGT GACC

24

配列番号：30

配列の特徴

配列の長さ：31塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：30

CCTCTGCGGC CGCTGTTGCA TTTCCTTTCT G

31

配列番号：31

配列の特徴

配列の長さ：19アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：31

Glu	Thr	Leu	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His	Tyr	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	His
1				5					10					15	
Gln Leu Leu															

配列番号：3 2

配列の特徴

配列の長さ：2 1 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：3 2

TCCCTTGCCC TGACCACTCT T

21

配列番号：3 3

配列の特徴

配列の長さ：3 4 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：3 3

CCTCTGCGGC CGCACACACG TTGTCATGTG TTGC

34

配列番号：34

配列の特徴

配列の長さ：21塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：34

TCCCTTGCCC TGACCACTCT T

21

配列番号：35

配列の特徴

配列の長さ：34塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：35

CCTCTGCGGC CGCCTTTTGC GTGGCTTCTC TGTT

34

配列番号：36

配列の特徴

配列の長さ：37塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：36

CCTCTGAGCT CAAGCTTGGT TTCCGGGGAC CACAATG

37

配列番号：37

配列の特徴

配列の長さ：38塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：37

CCTCTGCGGC CGCTAAGCAG CTTATTTTTA CTGAATGG

38

配列番号：38

配列の特徴

配列の長さ：37塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：38

CCTCTGAGCT CAAGCTTGGT TTCCGGGGAC CACAATG

37

配列番号：39

配列の特徴

配列の長さ：33塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：39

CCTCTGCGGC CGCCAGGGTA ACATCTATTC CAC

33

配列番号：40

配列の特徴

配列の長さ：35塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：40

CCGAAGCTTC CACCATGAAC AAGTGGCTGT GCTGC

35

配列番号：41

配列の特徴

配列の長さ：40塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：41

CCTCTGTCGA CTATTATAAG CAGCTTATTT TCACGGATTG

40

配列番号：4 2

配列の特徴

配列の長さ：2 1 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：4 2

TCCCTTGCCC TGACCACTCT T

21

配列番号：4 3

配列の特徴

配列の長さ：3 5 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：4 3

CCTCTGTCGA CTTAACACAC GTTGTCATGT GTTGC

35

配列番号：44

配列の特徴

配列の長さ：21塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：44

TCCCTTGCCC TGACCACTCT T

21

配列番号：45

配列の特徴

配列の長さ：35塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：45

CCTCTGTCGA CTTACTTTTG CGTGGCTTCT CTGTT

35

配列番号：46

配列の特徴

配列の長さ：1537塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：46

GTGAAGAGCG TGAAGAGCGG TTCCTCCTTT CAGCAAAAAA CCCCTCAAGA CCCGTTTAGA	60
GGCCCCAAGG GGTTATGCTA GTTATTGCTC AGCGGTGGCA GCAGCCAACT CAGCTTCCTT	120
TCGGGCTTTC TTCTTCTTCT TCTTCTTTCC GCGGATCCTC GAGTAAGCTT CCATGGTACC	180
CTGCAGGTCG AACTAGTGA GCTCGAATTC CAACGCGTTA ACCATATGTT ATTCTCCTT	240
TAATTAGTTA AAACAAATCT AGAATCAAAT CGATTAATCG ACTATAACAA ACCATTTTCT	300
TGCGTAAACC TGTACGATCC TACAGGTACT TATGTTAAAC AATTGTATTT CAAGCGATAT	360
AATAGTGTGA CAAAAATCCA ATTTATTAGA ATCAAATGTC AATCTATTAC CGTTTAAATG	420
ATATATAACA CGCAAACTT GCGACAAACA ATAGGTAAGG ATAAAGAGAT GGGTATGAAA	480
GACATAAATG CCGACGACAC TTACAGAATA ATTAATAAAA TTAAAGCCTG TAGAAGCAAT	540
AATGATATTA ATCAATGCTT ATCTGATATG ACTAAAATGG TACATTGTGA ATATTATTTA	600
CTCGCGATCA TTTATCCTCA TTCTATGGTT AAATCTGATA TTTCAATTCT GGATAATTAC	660
CCTAAAAAAT GGAGGCAATA TTATGATGAC GCTAATTTAA TAAATATGA TCCTATAGTA	720
GATTATTCTA ACTCCAATCA TTCACCGATT AATTGGAATA TATTTGAAAA CAATGCTGTA	780

AATAAAAAAT CTCCAAATGT AATTAAAGAA GCGAAATCAT CAGGTCTTAT CACTGGGTTT	840
AGTTTCCCTA TTCATACTGC TAATAATGGC TTCGGAATGC TTAGTTTTGC ACATTCAGAG	900
AAAGACAACT ATATAGATAG TTTATTTTTA CATGCGTGTA TGAACATACC ATTAATTGTT	960
CCTTCTCTAG TTGATAATTA TCGAAAAATA AATATAGCAA ATAATAAATC AAACAACGAT	1020
TTAACCAAAA GAGAAAAAGA ATGTTTAGCG TGGGCATGCG AAGGAAAAAG CTCTTGGGAT	1080
ATTTCAAAAA TATTAGGCTG TAGTAAGCGC ACGGTCACCT TCCATTTAAC CAATGCGCAA	1140
ATGAAACTCA ATACAACAAA CCGCTGCCAA AGTATTTCTA AAGCAATTTT AACAGGAGCA	1200
ATTGATTGCC CATACTTTAA AAGTTAAGTA CGACGTCCAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA	1260
ATAAACAAAA GAGTTTGTAG AAACGCAAAA AGGCCATCCG TCAGGATGGC CTTCTGCTTA	1320
ATTTGATGCC TGGCAGTTTA TGGCGGGCGT CCTGCCCGCC ACCCTCCGGG CCGTTGCTTC	1380
GCAACGTTCA AATCCGCTCC CGGCGGATTT GTCCTACTCA GGAGAGCGTT CACCGACAAA	1440
CAACAGATAA AACGAAAGGC CCAGTCTTTC GACTGAGCCT TTCGTTTTAT TTGATGCCTG	1500
GCAGTTCCTT ACTCTCGCAT GGGGAGACCA TGCATAC	1537

配列番号：47

配列の特徴

配列の長さ：48塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：47

CCGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GAGAAGTTTC TTCATCCA

48

配列番号：48

配列の特徴

配列の長さ：55塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：48

CGATTTGATT CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGTTAACGC GTTGAATTC GGTAC

55

配列番号：49

配列の特徴

配列の長さ：49塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：49

CGAATTCCAA CGCGTTAACC ATATGTTATT CCTCCTTCTA GAATCAAAT

49

配列番号：50

配列の特徴

配列の長さ：1546塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：50

GCGTAACGTA TGCATGGTCT CCCCATGCGA GAGTAGGGAA CTGCCAGGCA TCAAATAAAA	60
CGAAAGGCTC AGTCGAAAGA CTGGGCCTTT CGTTTTATCT GTTGTGTGTC GGTGAACGCT	120
CTCCTGAGTA GGACAAATCC GCCGGGAGCG GATTTGAACG TTGCGAAGCA ACGGCCCGGA	180
GGGTGGCGGG CAGGACGCCC GCCATAAACT GCCAGGCATC AAATTAAGCA GAAGGCCATC	240
CTGACGGATG GCCTTTTTGC GTTTCTACAA ACTCTTTTGT TTATTTTCTT AAATACATTC	300
AAATATGGAC GTCGTACTTA ACTTTTAAAG TATGGGCAAT CAATTGCTCC TGTTAAAATT	360
GCTTTAGAAA TACTTTGGCA GCGGTTTGTT GTATTGAGTT TCATTTGCGC ATTGGTTAAA	420
TGGAAAGTGA CCGTGCGCTT ACTACAGCCT AATATTTTGT AAATATCCCA AGAGCTTTTT	480
CCTTCGCATG CCCACGCTAA ACATTCTTTT TCTCTTTTGG TTAAATCGTT GTTTGATTTA	540
TTATTTGCTA TATTTATTTT TCGATAATTA TCAACTAGAG AAGGAACAAT TAATGGTATG	600
TTCATACACG CATGTAAAAA TAACTATCT ATATAGTTGT CTTTCTCTGA ATGTGCAAAA	660
CTAAGCATTC CGAAGCCATT ATTAGCAGTA TGAATAGGGA AACTAAACCC AGTGATAAGA	720
CCTGATGATT TCGCTTCTTT AATTACATTT GGAGATTTTT TATTTACAGC ATTGTTTTCA	780
AATATATTCC AATTAATCGG TGAATGATTG GAGTTAGAAT AATCTACTAT AGGATCATAT	840

TTTATTAAAT TAGCGTCATC ATAATATTGC CTCCATTTTT TAGGGTAATT ATCCAGAATT	900
GAAATATCAG ATTTAACCAT AGAATGAGGA TAAATGATCG CGAGTAAATA ATATTCACAA	960
TGTACCATTT TAGTCATATC AGATAAGCAT TGATTAAATAT CATTATTGCT TCTACAGGCT	1020
TTAATTTTAT TAATTATTCT GTAAGTGTCG TCGGCATTTA TGTCTTTCAT ACCCATCTCT	1080
TTATCCTTAC CTATTGTTTG TCGCAAGTTT TCGGTGTTAT ATATCATTAA AACGGTAATA	1140
GATTGACATT TGATTCTAAT AAATTGGATT TTTGTACAC TATTATATCG CTTGAAATAC	1200
AATTGTTTAA CATAAGTACC TGTAGGATCG TACAGGTTTA CGCAAGAAAA TGGTTTGTTA	1260
TAGTCGATTA ATCGATTTGA TTCTAGATTT GTTTTAACTA ATTAAAGGAG GAATAACATA	1320
TGGTTAACGC GTTGAATTC GAGCTCACTA GTGTCGACCT GCAGGGTACC ATGGAAGCTT	1380
ACTCGAGGAT CCGCGGAAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAAGC CCGAAAGGAA GCTGAGTTGG	1440
CTGCTGCCAC CGCTGAGCAA TAACTAGCAT AACCCCTTGG GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA	1500
GGGGTTTTTT GCTGAAAGGA GGAACCGCTC TTCACGCTCT TCACGC	1546

配列番号：51

配列の特徴

配列の長さ：47塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：51

TATGAAACAT CATCACCATC ACCATCATGC TAGCGTTAAC GCGTTGG

配列番号：52

配列の特徴

配列の長さ：49塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：52

AATCCAACG CGTTAACGCT AGCATGATGG TGATGGTGAT GATGTTTCA

49

配列番号：53

配列の特徴

配列の長さ：141塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：53

CTAATTCCGC TCTCACCTAC CAAACAATGC CCCCTGCAA AAAATAAATT CATATAAAAA	60
ACATACAGAT AACCATCTGC GGTGATAAAT TATCTCTGGC GGTGTTGACA TAAATACCAC	120
TGGCGGTGAT ACTGAGCACA T	141

配列番号：5 4

配列の特徴

配列の長さ：1 4 7 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：5 4

CGATGTGCTC AGTATCACCG CCAGTGGTAT TTATGTCAAC ACCGCCAGAG ATAATTTATC	60
ACCGCAGATG GTTATCTGTA TGTTTTTTTAT ATGAATTTAT TTTTTCAGG GGGGCATTGT	120
TTGGTAGGTG AGAGCGGAAT TAGACGT	147

配列番号：5 5

配列の特徴

配列の長さ：5 5 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：5 5

CGATTGATT CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGTTAACGC GTTGAATTC CGTAC

55

配列番号：5 6

配列の特徴

配列の長さ：4 9 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：5 6

CGAATTCCAA CGCGTTAACC ATATGTTATT CCTCCTTCTA GAATCAAAT

49

配列番号：5 7

配列の特徴

配列の長さ：6 6 8 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：5 7

GTGAAGAGCG TGAAGAGCGG TTCCTCCTTT CAGCAAAAAA CCCCTCAAGA CCCGTTTAGA	60
GGCCCCAAGG GGTATGCTA GTTATTGCTC AGCGGTGGCA GCAGCCAACT CAGCTTCCTT	120
TCGGGCTTTC TTCTTCTTCT TCTTCTTTCC GCGGATCCTC GAGTAAGCTT CCATGGTACC	180
CTGCAGGTCG ACACTAGTGA GCTCGAATTC CAACGCGTTA ACCATATGTT ATTCCTCCTT	240
TAATTAGTTA ACTCAAATCT AGAATCAAAT CGATAAATTG TGAGCGCTCA CAATTGAGAA	300
TATTAATCAA GAATTTTAGC ATTTGTCAAA TGAATTTTTT AAAAATTATG AGACGTCCAT	360
ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAA GAGTTTGTAG AAACGCAAAA AGGCCATCCG	420
TCAGGATGGC CTTCTGCTTA ATTTGATGCC TGGCAGTTTA TGGCGGGCGT CCTGCCCCGCC	480
ACCCCTCCGGG CCGTTGCTTC GCAACGTTCA AATCCGCTCC CGGCGGATTT GTCCTACTCA	540
GGAGAGCGTT CACCGACAAA CAACAGATAA AACGAAAGGC CCAGTCTTTC GACTGAGCCT	600
TTCGTTTTAT TTGATGCCTG GCAGTTCCTT ACTCTCGCAT GGGGAGACCA TGCATACGTT	660
ACGCACGT	668

配列番号：5 8

配列の特徴

配列の長さ：7 2 6塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：58

GCGTAACGTA TGCATGGTCT CCCCATGCGA GAGTAGGGAA CTGCCAGGCA TCAAATAAAA	60
CGAAAGGCTC AGTCGAAAGA CTGGGCCTTT CGTTTTATCT GTTGTTTGTC GGTGAACGCT	120
CTCCTGAGTA GGACAAATCC GCCGGGAGCG GATTTGAACG TTGCGAAGCA ACGGCCCGGA	180
GGGTGGCGGG CAGGACGCCC GCCATAAACT GCCAGGCATC AAATTAAGCA GAAGGGGCCT	240
CCCACCGCCC GTCCTGCGGG CGGTATTTGA CGGTCCGTAG TTTAATTCGT CTCGCCATC	300
CTGACGGATG GCCTTTTTGC GTTCTACAA ACTCTTTTGT TTATTTTCT AAATACATTC	360
AAATATGGAC GTCTCATAAT TTTTAAAAA TTCATTTGAC AAATGCTAAA ATTCTTGATT	420
AATATTCTCA ATTGTGAGCG CTCACAATTT ATCGATTTGA TTCTAGATTT GTTTTAACTA	480
ATTAAAGGAG GAATAACATA TGGTTAACGC GTTGGAATTC GAGCTCATA GTGTGACCT	540
GCAGGGTACC ATGGAAGCTT ACTCGAGGAT CCGCGGAAAG AAGAAGAAGA AGAAGAAAGC	600
CCGAAAGGAA GCTGAGTTGG CTGCTGCCAC CGCTGAGCAA TAACTAGCAT AACCCTTGG	660
GGCCTCTAAA CGGGTCTTGA GGGGTTTTTT GCTGAAAGGA GGAACCGCTC TTCACGCTCT	720
TCACGC	726

配列番号：59

配列の特徴

配列の長さ：44塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：59

TACGCACTGG ATCCTTATAA GCAGCTTATT TTTACTGATT GGAC

44

配列番号：60

配列の特徴

配列の長さ：27塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：60

GTCCTCCTGG TACCTACCTA AAACAAC

27

配列番号：61

配列の特徴

配列の長さ：102塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：61

```
TATGGATGAA GAAACTTCTC ATCAGCTGCT GTGTGATAAA TGTCGCCCGG GTACCCGGCG      60
GACATTTATC ACACAGCAGC TGATGAGAAG TTTCTTCATC CA                          102
```

配列番号：62

配列の特徴

配列の長さ：19アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：62

```
Met Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro
 1           5           10          15
Gly Thr Tyr
```


配列番号：63

配列の特徴

配列の長さ：84塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：63

```
TATGGAAACT TTCCTCCAA AATATCTCA TTATGATGAA GAAACTTCTC ATCAGCTGCT      60
GIGTGATAAA TGTCCGCCGG GTAC                                             84
```

配列番号：64

配列の特徴

配列の長さ：78塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：64

CCGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GAGAAGTTTC TTCATCATAA TGAAGATATT 60
TTGGAGGAAA AGTTTCCA 78

配列番号：65

配列の特徴

配列の長さ：44塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：65

TACGCACTGG ATCCTTATAA GCAGCTTATT TTCACGGATT GAAC 44

配列番号：66

配列の特徴

配列の長さ：38塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：66

GTGCTCCTGG TACCTACCTA AAACAGCACT GCACAGTG

38

配列番号：67

配列の特徴

配列の長さ：84塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：67

TATGGAAACT CTGCCTCCAA AATACCTGCA TTACGATCCG GAAACTGGTC ATCAGCTGCT
GTGTGATAAA TGTGCTCCGG GTAC

60

84

配列番号：68

配列の特徴

配列の長さ：78塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：68

```
CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC CGGATCGTAA TGCAGGTATT      60
TTGGAGGCAG AGTTTCCA                                     78
```

配列番号：69

配列の特徴

配列の長さ：54塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：69

```
TATGGACCCA GAAACTGGTC ATCAGCTGCT GTGTGATAAA TGTGCTCCGG GTAC      54
```

配列番号：70

配列の特徴

配列の長さ：48塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：70

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC TGGGTCCA

48

配列番号：71

配列の特徴

配列の長さ：87塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：71

TATGAAAGAA ACTCTGCCTC CAAAATACCT GCATTACGAT CCGGAAACTG GTCATCAGCT

60

GCTGTGTGAT AAATGTGCTC CGGGTAC

87

配列番号：72

配列の特徴

配列の長さ：81塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：72

```
CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC CGGATCGTAA TGCAGGTATT      60
TTGGAGGCAG AGTTTCTTTC A                                     81
```

配列番号：73

配列の特徴

配列の長さ：71塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：73

```
GTTCTCCTCA TATGAAACAT CATCACCATC ACCATCATGA AACTCTGCCT CCAAATACC      60
TGCATTACGA T                                               71
```

配列番号：74

配列の特徴

配列の長さ：43塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：74

GTTCTCCTCA TATGAAAGAA ACTCTGCCTC CAAAATACCT GCA

43

配列番号：75

配列の特徴

配列の長さ：76塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：75

TACGCACTGG ATCCTTAATG ATGGTGATGG TGATGATGTA AGCAGCTTAT TTTCACGGAT 60
TGAACCTGAT TCCCTA 76

配列番号：76

配列の特徴

配列の長さ：47塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：76

GTTCCTCTCA TATGAAATAC CTGCATTACG ATCCGGAAAC TGGTCAT 47

配列番号：77

配列の特徴

配列の長さ：43塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：77

GTTCTCCTAT TAATGAAATA TCTTCATTAT GATGAAGAAA CTT

43

配列番号：78

配列の特徴

配列の長さ：40塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：78

TACGCACTGG ATCCTTATAA GCAGCTTATT TTTACTGATT

40

配列番号：79

配列の特徴

配列の長さ：40塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：79

GTTCTCCTCA TATGGAACT CTGCCTCCAA AATACCTGCA

40

配列番号：80

配列の特徴

配列の長さ：43塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：80

TACGCACTGG ATCCTTATGT TGCATTCCT TTCTGAATTA GCA

43

配列番号：81

配列の特徴

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：81

CCGGAAACAG ATAATCAG

18

配列番号：82

配列の特徴

配列の長さ：18塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：82

GATCCTCATT ATCTGTTT

18

配列番号：83

配列の特徴

配列の長さ：30塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：83

CCGGAAACAG AGAAGCCACG CAAAAGTAAG

30

配列番号：84

配列の特徴

配列の長さ：30塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：84

GATCCTTACT TTTGCGTGGC TTCTCTGTTT

30

配列番号：85

配列の特徴

配列の長さ：12塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：85

TATGTTAATG AG

12

配列番号：86

配列の特徴

配列の長さ：14塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：86

GATCCTCATT AACA

14

配列番号：87

配列の特徴

配列の長さ：21塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：87

TATGTTCCGG AAACAGTTAA G

21

配列番号：88

配列の特徴

配列の長さ：23塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：88

GATCCTTAAC TGTTTCCGGA ACA

23

配列番号：89

配列の特徴

配列の長さ：36塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：89

TATGTTCCGG AAACAGTGAA TCAACTCAAA AATAAG

36

配列番号：90

配列の特徴

配列の長さ：38塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：90

GATCCTTATT TTTGAGTTGA TTCACTGTTT CCGGAACA

38

配列番号：9 1

配列の特徴

配列の長さ：1 0 0 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：9 1

```
CTAGCGACGA CGACGACAAA GAAACTCTGC CTCCAAAATA CCTGCATTAC GATCCGAAAA      60
CTGGTCATCA GCTGCTGTGT GATAAATGTG CTCCGGGTAC                               100
```

配列番号：9 2

配列の特徴

配列の長さ：9 2 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：9 2

CCGGAGCACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACCAGTTTC CGGATCGTAA TGCAGGTATT 60
TTGGAGGCAG AGTTTCTTTG TCGTCGTCGT CG 92

配列番号：93

配列の特徴

配列の長さ：26塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：93

ACAAACACAA TCGATTGAT ACTAGA

26

配列番号：94

配列の特徴

配列の長さ：50塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：9 4

TTTGTTTTAA CTAATTAAAG GAGGAATAAA ATATGAGAGG ATCGCATCAC

50

配列番号：9 5

配列の特徴

配列の長さ：5 0 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：9 5

CATCACCATC ACGAAACCTT CCCGCCGAAA TACCTGCACT ACGACGAAGA

50

配列番号：9 6

配列の特徴

配列の長さ：4 9 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：96

AACCTCCCAC CAGCTGCTGT GCGACAAATG CCCGCCGGGT ACCCAAACA

49

配列番号：97

配列の特徴

配列の長さ：26塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：97

TGTTTGGGTA CCCGGCGGGC ATTTGT

26

配列番号：98

配列の特徴

配列の長さ：50塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：9 8

CGCACAGCAG CTGGTGGGAG GTTTCTTCGT CGTAGTGCAG GTATTTCGGC

50

配列番号：9 9

配列の特徴

配列の長さ：4 9 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：9 9

GGAAGGTTT CGTGATGGTG ATGGTGATGC GATCCTCTCA TATTTTATT

49

配列番号：1 0 0

配列の特徴

配列の長さ：5 0 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：100

CCTCCTTTAA TTAGTTAAAA CAAATCTAGT ATCAAATCGA TTGTGTTTGT

50

配列番号：101

配列の特徴

配列の長さ：59塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：101

ACAAACACAA TCGATTGAT ACTAGATTG TTTTAACTAA TTAAAGGAGG AATAAAATG

59

配列番号：102

配列の特徴

配列の長さ：48塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：102

CTAATTAAAG GAGGAATAAA ATGAAAGAAA CTTTTCCTCC AAAATATC

48

配列番号：103

配列の特徴

配列の長さ：31塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：103

TGTTTGGGTA CCCGGCGGAC ATTTATCACA C

31

配列番号：104

配列の特徴

配列の長さ：59塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：104

ACAAACACAA TCGATTGAT ACTAGATTG TTTTAACTAA TTAAAGGAGG AATAAAATG

59

配列番号：105

配列の特徴

配列の長さ：54塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：105

CTAATTAAAG GAGGAATAAA ATGAAAAAAA AAGAACTTT TCCTCCAAAA TATC

54

配列番号：106

配列の特徴

配列の長さ：31塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：106

TGTTTGGGTA CCCGGCGGAC ATTTATCACA C

31

配列番号：107

配列の特徴

配列の長さ：44塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：107

CAGCCCGGGT AAAATGGAAA CGTTTCCTCC AAAATATCTT CATT

44

配列番号：108

配列の特徴

配列の長さ：44塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：108

CGTTTCCATT TTACCCGGGC TGAGCGAGAG GCTCTTCTGC GTGT

44

配列番号：109

配列の特徴

配列の長さ：45塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：109

CGCTCAGCCC GGGTAAAATG GAAACGTTGC CTCCAAAATA CCTGC

45

配列番号：1 1 0

配列の特徴

配列の長さ：39塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：1 1 0

CCATTTTACC CGGGCTGAGC GAGAGGCTCT TCTGCGTGT

39

配列番号：1 1 1

配列の特徴

配列の長さ：36塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：1 1 1

GAAAATAAGC TGCTTAGCTG CAGCTGAACC AAAATC

36

配列番号：1 1 2

配列の特徴

配列の長さ：34塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：1 1 2

CAGCTGCAGC TAAGCAGCTT ATTTTCACGG ATTG

34

配列番号：1 1 3

配列の特徴

配列の長さ：36塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：1 1 3

AAAAATAAGC TGCTTAGCTG CAGCTGAACC AAAATC

36

配列番号：1 1 4

配列の特徴

配列の長さ：3 5 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：1 1 4

CAGCTGCAGC TAAGCAGCTT ATTTTACTG ATTGG

35

配列番号：1 1 5

配列の特徴

配列の長さ：1 0 2 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：1 1 5

CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGAACTTT TGCTCCAAA TATCTTCATT ATGATGAAGA 60
AACTAGTCAT CAGCTGCTGT GTGATAAATG TCCGCCGGGT AC 102

配列番号：1 1 6

配列の特徴

配列の長さ：9 4 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：1 1 6

CCGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GACTAGTTTC TTCATCATAA TGAAGATATT 60
TTGGAGCAAA AGTTTCCATA TGTTATTCCT CCTT 94

配列番号：1 1 7

配列の特徴

配列の長さ：6 2 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：117

```
CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGAAACTTT TCCTGCTAAA TATCTTCATT ATGATGAAGA 60
AA 62
```

配列番号：118

配列の特徴

配列の長さ：62塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：118

```
CTAGTTTCTT CATCATAATG AAGATATTTA GCAGGAAAAG TTTCCATATG TTATTCCTCC 60
TT 62
```

配列番号：119

配列の特徴

配列の長さ：51アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：119

```

Tyr His Tyr Tyr Asp Gln Asn Gly Arg Met Cys Glu Glu Cys His Met
1          5          10          15
Cys Gln Pro Gly His Phe Leu Val Lys His Cys Lys Gln Pro Lys Arg
          20          25          30
Asp Thr Val Cys His Lys Pro Cys Glu Pro Gly Val Thr Tyr Thr Asp
          35          40          45
Asp Trp His
          50

```

配列番号：120

配列の特徴

配列の長さ：2432塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

(i x) 配列の特徴 :

配列を表す記号 : C D S

存在位置 : 1 2 4 . . 1 3 2 6

配列の記載 : 配列番号 : 1 2 0

ATCAAAGGCA GGGCATACTT CCTGTTGCCG AGACCTTATA TAAACGTCA TGTTCGCCTG	60
GGCAGCAGAG AAGCACCTAG CACTGGCCCA GCGGCTGCCG CCTGAGGTTT CCAGAGGACC	120
ACA ATG AAC AAG TGG CTG TGC TGT GCA CTC CTG GTG TTC TTG GAC ATC Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Phe Leu Asp Ile 1 5 10 15	168
ATT GAA TGG ACA ACC CAG GAA ACC TTT CCT CCA AAA TAC TTG CAT TAT Ile Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr 20 25 30	216
GAC CCA GAA ACC GGA CGT CAG CTC TTG TGT GAC AAA TGT GCT CCT GGC Asp Pro Glu Thr Gly Arg Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly 35 40 45	264
ACC TAC CTA AAA CAG CAC TGC ACA GTC AGG AGG AAG ACA CTG TGT GTC Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val 50 55 60	312
CCT TGC CCT GAC TAC TCT TAT ACA GAC AGC TGG CAC ACG AGT GAT GAA Pro Cys Pro Asp Tyr Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu 65 70 75	360
TGC GTG TAC TGC AGC CCC GTG TGC AAG GAA CTG CAG ACC GTG AAA CAG Cys Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Thr Val Lys Gln 80 85 90 95	408
GAG TGC AAC CGC ACC CAC AAC CGA GTG TGC GAA TGT GAG GAA GGG CGC Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg 100 105 110	456
TAC CTG GAG CTC GAA TTC TGC TTG AAG CAC CGG AGC TGT CCC CCA GGC Tyr Leu Glu Leu Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly 115 120 125	504
TTG GGT GTG CTG CAG GCT GGG ACC CCA GAG CGA AAC ACG GTT TGC AAA Leu Gly Val Leu Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys 130 135 140	552

AGA TGT CCG GAT GGG TTC TTC TCA GGT GAG ACG TCA TCG AAA GCA CCC	600
Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro	
145 150 155	
TGT AGG AAA CAC ACC AAC TGC AGC TCA CTT GGC CTC CTG CTA ATT CAG	648
Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Leu Ile Gln	
160 165 170 175	
AAA GGA AAT GCA ACA CAT GAC AAT GTA TGT TCC GGA AAC AGA GAA GCA	696
Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala	
180 185 190	
ACT CAA AAT TGT GGA ATA GAT GTC ACC CTG TGC GAA GAG GCA TTC TTC	744
Thr Gln Asn Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe	
195 200 205	
AGG TTT GCT GTG CCT ACC AAG ATT ATA CCG AAT TGG CTG AGT GTT CTG	792
Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu	
210 215 220	
GTG GAC AGT TTG CCT GGG ACC AAA GTG AAT GCA GAG AGT GTA GAG AGG	840
Val Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg	
225 230 235	
ATA AAA CGG AGA CAC AGC TCG CAA GAG CAA ACT TTC CAG CTA CTT AAG	888
Ile Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys	
240 245 250 255	
CTG TGG AAG CAT CAA AAC AGA GAC CAG GAA ATG GTG AAG AAG ATC ATC	936
Leu Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile	
260 265 270	
CAA GAC ATT GAC CTC TGT GAA AGC AGT GTG CAA CGG CAT ATC GGC CAC	984
Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Ile Gly His	
275 280 285	
GCG AAC CTC ACC ACA GAG CAG CTC CGC ATC TTG ATG GAG AGC TTG CCT	1032
Ala Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Arg Ile Leu Met Glu Ser Leu Pro	
290 295 300	
GGG AAG AAG ATC AGC CCA GAC GAG ATT GAG AGA ACG AGA AAG ACC TGC	1080
Gly Lys Lys Ile Ser Pro Asp Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys	
305 310 315	
AAA CCC AGC GAG CAG CTC CTG AAG CTA CTG AGC TTG TGG AGG ATC AAA	1128
Lys Pro Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys	
320 325 330 335	
AAT GGA GAC CAA GAC ACC TTG AAG GGC CTG ATG TAC GCA CTC AAG CAC	1176
Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His	
340 345 350	
TTG AAA GCA TAC CAC TTT CCC AAA ACC GTC ACC CAC AGT CTG AGG AAG	1224
Leu Lys Ala Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys	
355 360 365	

ACC ATC AGG TTC TTG CAC AGC TTC ACC ATG TAC CGA TTG TAT CAG AAA	1272
Thr Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys	
370 375 380	
CTC TTT CTA GAA ATG ATA GGG AAT CAG GTT CAA TCA GTG AAG ATA AGC	1320
Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser	
385 390 395	
TGC TTA TAGTTAGGAA TGGTCACTGG GCTGTTTCTT CAGGATGGGC CAACACTGAT	1376
Cys Leu	
400	
GGAGCAGATG GCTGCTTCTC CGGCTCTTGA AATGGCAGTT GATTCTTTTC TCATCAGTTG	1436
GTGGGAATGA AGATCCTCCA GCCCAACACA CACACTGGGG AGTCTGAGTC AGGAGAGTGA	1496
GGCAGGCTAT TTGATAATTG TGCAAAGCTG CCAGGTGTAC ACCTAGAAAG TCAAGCACCC	1556
TGAGAAAGAG GATATTTTTA TAACCTCAAA CATAGGCCCT TTCCTTCCTC TCCTTATGGA	1616
TGAGTACTCA GAAGGCTTCT ACTATCTTCT GTGTCATCCC TAGATGAAGG CCTCTTTTAT	1676
TTATTTTTTT ATTCTTTTTT TCGGAGCTGG GGACCGAACC CAGGGCCTTG CGCTTGCGAG	1736
GCAAGTGCTC TACCACTGAG CTAAATCTCC AACCCTGAA GGCTCTTTTC TTTCTGCCTC	1796
TGATAGTCTA TGACATTCTT TTTTCTACAA TTCGTATCAG GTGCACGAGC CTTATCCCAT	1856
TTGTAGGTTT CTAGGCAAGT TGACCGTTAG CTATTTTTCC CTCTGAAGAT TTGATTGAG	1916
TTGCAGACTT GGCTAGACAA GCAGGGGTAG GTTATGGTAG TTTATTTAAC AGACTGCCAC	1976
CAGGAGTCCA GTGTTTCTTG TTCCTCTGTA GTTGTACCTA AGCTGACTCC AAGTACATTT	2036
AGTATGAAAA ATAATCAACA AATTTTATTC CTTCTATCAA CATTGGCTAG CTTTGTTTCA	2096
GGGCACTAAA AGAACTACT ATATGGAGAA AGAATTGATA TTGCCCCCAA CGTTCAACAA	2156
CCCAATAGTT TATCCAGCTG TCATGCCTGG TTCAGTGTCT ACTGACTATG CGCCCTCTTA	2216
TTACTGCATG CAGTAATTCA ACTGGAAATA GTAATAATAA TAATAGAAAT AAAATCTAGA	2276
CTCCATTGGA TCTCTCTGAA TATGGGAATA TCTAACTTAA GAAGCTTTGA GATTTGAGTT	2336
GTGTTAAAGG CTTTTATTAA AAAGCTGATG CTCTTCTGTA AAAGTTACTA ATATATCTGT	2396
AAGACTATTA CAGTATTGCT ATTTATATCC ATCCAG	2432

配列の特徴

配列の型：アミノ酸

配列の種類：蛋白質

Met	Asn	Lys	Trp	Leu	Cys	Cys	Ala	Leu	Leu	Val	Phe	Leu	Asp	Ile	Ile
1				5					10					15	
Glu	Trp	Thr	Thr	Gln	Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His	Tyr	Asp
			20					25					30		
Pro	Glu	Thr	Gly	Arg	Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Ala	Pro	Gly	Thr
		35					40					45			
Tyr	Leu	Lys	Gln	His	Cys	Thr	Val	Arg	Arg	Lys	Thr	Leu	Cys	Val	Pro
	50					55					60				
Cys	Pro	Asp	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His	Thr	Ser	Asp	Glu	Cys
65					70					75					80
Val	Tyr	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Lys	Glu	Leu	Gln	Thr	Val	Lys	Gln	Glu
				85					90					95	
Cys	Asn	Arg	Thr	His	Asn	Arg	Val	Cys	Glu	Cys	Glu	Glu	Gly	Arg	Tyr
			100					105					110		
Leu	Glu	Leu	Glu	Phe	Cys	Leu	Lys	His	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Leu
		115					120					125			
Gly	Val	Leu	Gln	Ala	Gly	Thr	Pro	Glu	Arg	Asn	Thr	Val	Cys	Lys	Arg
	130					135					140				
Cys	Pro	Asp	Gly	Phe	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	Cys
145					150					155					160
Arg	Lys	His	Thr	Asn	Cys	Ser	Ser	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Lys
				165					170					175	

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr
 180 185 190
 Gln Asn Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
 195 200 205
 Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
 210 215 220
 Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
 225 230 235 240
 Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
 245 250 255
 Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln
 260 265 270
 Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala
 275 280 285
 Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Arg Ile Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
 290 295 300
 Lys Lys Ile Ser Pro Asp Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys
 305 310 315 320
 Pro Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
 325 330 335
 Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu
 340 345 350
 Lys Ala Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr
 355 360 365
 Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu
 370 375 380
 Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys
 385 390 395 400
 Leu

配列番号：1 2 2

配列の特徴

配列の長さ：1 3 2 4 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

(i x) 配列の特徴

配列を表す記号：C D S

存在位置：9 0 . . 1 2 9 2

配列の記載：配列番号：1 2 2

CCTTATATAA ACGTCATGAT TGCCTGGGCT GCAGAGACGC ACCTAGCACT GACCCAGCGG	60
CTGCCTCCTG AGGTTTCCCG AGGACCACA ATG AAC AAG TGG CTG TGC TGC GCA	113
Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala	
1 5	
CTC CTG GTG CTC CTG GAC ATC ATT GAA TGG ACA ACC CAG GAA ACC CTT	161
Leu Leu Val Leu Leu Asp Ile Ile Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Leu	
10 15 20	
CCT CCA AAG TAC TTG CAT TAT GAC CCA GAA ACT GGT CAT CAG CTC CTG	209
Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Pro Glu Thr Gly His Gln Leu Leu	
25 30 35 40	
TGT GAC AAA TGT GCT CCT GGC ACC TAC CTA AAA CAG CAC TGC ACA GTG	257
Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val	
45 50 55	
AGG AGG AAG ACA TTG TGT GTC CCT TGC CCT GAC CAC TCT TAT ACG GAC	305
Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro Cys Pro Asp His Ser Tyr Thr Asp	
60 65 70	

AGC	TGG	CAC	ACC	AGT	GAT	GAG	TGT	GTG	TAT	TGC	AGC	CCA	GTG	TGC	AAG	353
Ser	Trp	His	Thr	Ser	Asp	Glu	Cys	Val	Tyr	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Lys	
		75					80					85				
GAA	CTG	CAG	TCC	GTG	AAG	CAG	GAG	TGC	AAC	CGC	ACC	CAC	AAC	CGA	GTG	401
Glu	Leu	Gln	Ser	Val	Lys	Gln	Glu	Cys	Asn	Arg	Thr	His	Asn	Arg	Val	
	90					95					100					
TGT	GAG	TGT	GAG	GAA	GGG	CGT	TAC	CTG	GAG	ATC	GAA	TTC	TGC	TTG	AAG	449
Cys	Glu	Cys	Glu	Glu	Gly	Arg	Tyr	Leu	Glu	Ile	Glu	Phe	Cys	Leu	Lys	
105					110					115					120	
CAC	CGG	AGC	TGT	CCC	CCG	GGC	TCC	GGC	GTG	GTG	CAA	GCT	GGA	ACC	CCA	497
His	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Ser	Gly	Val	Val	Gln	Ala	Gly	Thr	Pro	
				125					130					135		
GAG	CGA	AAC	ACA	GTT	TGC	AAA	AAA	TGT	CCA	GAT	GGG	TTC	TTC	TCA	GGT	545
Glu	Arg	Asn	Thr	Val	Cys	Lys	Lys	Cys	Pro	Asp	Gly	Phe	Phe	Ser	Gly	
			140					145					150			
GAG	ACT	TCA	TCG	AAA	GCA	CCC	TGT	ATA	AAA	CAC	ACG	AAC	TGC	AGC	ACA	593
Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	Cys	Ile	Lys	His	Thr	Asn	Cys	Ser	Thr	
	155						160					165				
TTT	GGC	CTC	CTG	CTA	ATT	CAG	AAA	GGA	AAT	GCA	ACA	CAT	GAC	AAC	GTG	641
Phe	Gly	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Lys	Gly	Asn	Ala	Thr	His	Asp	Asn	Val	
	170					175					180					
TGT	TCC	GGA	AAC	AGA	GAA	GCC	ACG	CAA	AAG	TGT	GGA	ATA	GAT	GTC	ACC	689
Cys	Ser	Gly	Asn	Arg	Glu	Ala	Thr	Gln	Lys	Cys	Gly	Ile	Asp	Val	Thr	
185					190					195					200	
CTG	TGT	GAA	GAG	GCC	TTC	TTC	AGG	TTT	GCT	GTT	CCT	ACC	AAG	ATT	ATA	737
Leu	Cys	Glu	Glu	Ala	Phe	Phe	Arg	Phe	Ala	Val	Pro	Thr	Lys	Ile	Ile	
				205					210					215		
CCA	AAT	TGG	CTG	AGT	GTT	TTG	GTG	GAC	AGT	TTG	CCT	GGG	ACC	AAA	GTG	785
Pro	Asn	Trp	Leu	Ser	Val	Leu	Val	Asp	Ser	Leu	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	
			220					225					230			
AAT	GCC	GAG	AGT	GTA	GAG	AGG	ATA	AAA	CGG	AGA	CAC	AGC	TCA	CAA	GAG	833
Asn	Ala	Glu	Ser	Val	Glu	Arg	Ile	Lys	Arg	Arg	His	Ser	Ser	Gln	Glu	
	235						240					245				
CAA	ACC	TTC	CAG	CTG	CTG	AAG	CTG	TGG	AAA	CAT	CAA	AAC	AGA	GAC	CAG	881
Gln	Thr	Phe	Gln	Leu	Leu	Lys	Leu	Trp	Lys	His	Gln	Asn	Arg	Asp	Gln	
	250					255					260					
GAA	ATG	GTG	AAG	AAG	ATC	ATC	CAA	GAC	ATT	GAC	CTC	TGT	GAA	AGC	AGC	929
Glu	Met	Val	Lys	Lys	Ile	Ile	Gln	Asp	Ile	Asp	Leu	Cys	Glu	Ser	Ser	
265					270					275					280	
GTG	CAG	CGG	CAT	CTC	GGC	CAC	TCG	AAC	CTC	ACC	ACA	GAG	CAG	CTT	CTT	977
Val	Gln	Arg	His	Leu	Gly	His	Ser	Asn	Leu	Thr	Thr	Glu	Gln	Leu	Leu	
				285					290					295		

GCC TTG ATG GAG AGC CTG CCT GGG AAG AAG ATC AGC CCA GAA GAG ATT	1025
Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Ile Ser Pro Glu Glu Ile	
300 305 310	
GAG AGA ACG AGA AAG ACC TGC AAA TCG AGC GAG CAG CTC CTG AAG CTA	1073
Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys Ser Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu	
315 320 325	
CTC AGT TTA TGG AGG ATC AAA AAT GGT GAC CAA GAC ACC TTG AAG GGC	1121
Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly	
330 335 340	
CTG ATG TAT GCC CTC AAG CAC TTG AAA ACA TCC CAC TTT CCC AAA ACT	1169
Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu Lys Thr Ser His Phe Pro Lys Thr	
345 350 355 360	
GTC ACC CAC AGT CTG AGG AAG ACC ATG AGG TTC CTG CAC AGC TTC ACA	1217
Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr Met Arg Phe Leu His Ser Phe Thr	
365 370 375	
ATG TAC AGA CTG TAT CAG AAG CTC TTT TTA GAA ATG ATA GGG AAT CAG	1265
Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln	
380 385 390	
GTT CAA TCC GTG AAA ATA AGC TGC TTA TAACTAGGAA TGGTCACTGG	1312
Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu	
395 400	
GCTGTTTCTT CA	1324

配列番号：1 2 3

配列の特徴

配列の長さ：401 アミノ酸

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：1 2 3

```

Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Leu Leu Asp Ile Ile
 1           5           10           15

Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Leu Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
          20           25           30

Pro Glu Thr Gly His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr
          35           40           45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro
 50           55           60

Cys Pro Asp His Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
 65           70           75           80

Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Ser Val Lys Gln Glu
          85           90           95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr
          100           105           110

Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Ser
 115           120           125

Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Lys
 130           135           140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
 145           150           155           160

Ile Lys His Thr Asn Cys Ser Thr Phe Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys
          165           170           175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr
          180           185           190

Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
 195           200           205

```



```

Phe Ala Val Pro Thr Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
210                      215                      220

Asp Ser Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
225                      230                      235                      240

Lys Arg Arg His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
                245                      250                      255

Trp Lys His Gln Asn Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln
                260                      265                      270

Asp Ile Asp Leu Cys Glu Ser Ser Val Gln Arg His Leu Gly His Ser
275                      280                      285

Asn Leu Thr Thr Glu Gln Leu Leu Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
290                      295                      300

Lys Lys Ile Ser Pro Glu Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys
305                      310                      315                      320

Ser Ser Glu Gln Leu Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn
                325                      330                      335

Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu
                340                      345                      350

Lys Thr Ser His Phe Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr
                355                      360                      365

Met Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu
370                      375                      380

Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys
385                      390                      395                      400

Leu

```

配列番号：1 2 4

配列の特徴

配列の長さ：1 3 5 5 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

(i x) 配列の特徴：

配列を表す記号：C D S

存在位置：9 4 . 1 2 9 6

配列の記載：配列番号：1 2 4

GTATATATAA CGTGATGAGC GTACGGGTGC GGAGACGCAC CGGAGCGCTC GCCCAGCCGC	60
CGCTCCAAGC CCCTGAGGTT TCCGGGGACC ACA ATG AAC AAG TTG CTG TGC TGC	114
Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys	
1 5	
GCG CTC GTG TTT CTG GAC ATC TCC ATT AAG TGG ACC ACC CAG GAA ACG	162
Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr	
10 15 20	
TTT CCT CCA AAG TAC CTT CAT TAT GAC GAA GAA ACC TCT CAT CAG CTG	210
Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp Glu Glu Thr Ser His Gln Leu	
25 30 35	
TTG TGT GAC AAA TGT CCT CCT GGT ACC TAC CTA AAA CAA CAC TGT ACA	258
Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr	
40 45 50 55	
GCA AAG TGG AAG ACC GTG TGC GCC CCT TGC CCT GAC CAC TAC TAC ACA	306
Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr	
60 65 70	
GAC AGC TGG CAC ACC AGT GAC GAG TGT CTA TAC TGC AGC CCC GTG TGC	354
Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys	
75 80 85	
AAG GAG CTG CAG TAC GTC AAG CAG GAG TGC AAT CGC ACC CAC AAC CGC	402
Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu Cys Asn Arg Thr His Asn Arg	
90 95 100	
GTG TGC GAA TGC AAG GAA GGG CGC TAC CTT GAG ATA GAG TTC TGC TTG	450
Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu	
105 110 115	

AAA CAT AGG AGC TGC CCT CCT GGA TTT GGA GTG GTG CAA GCT GGA ACC Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe Gly Val Val Gln Ala Gly Thr 120 125 130 135	498
CCA GAG CGA AAT ACA GTT TGC AAA AGA TGT CCA GAT GGG TTC TTC TCA Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser 140 145 150	546
AAT GAG ACG TCA TCT AAA GCA CCC TGT AGA AAA CAC ACA AAT TGC AGT Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys Arg Lys His Thr Asn Cys Ser 155 160 165	594
GTC TTT GGT CTC CTG CTA ACT CAG AAA GGA AAT GCA ACA CAC GAC AAC Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys Gly Asn Ala Thr His Asp Asn 170 175 180	642
ATA TGT TCC GGA AAC AGT GAA TCA ACT CAA AAA TGT GGA ATA GAT GTT Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val 185 190 195	690
ACC CTG TGT GAG GAG GCA TTC TTC AGG TTT GCT GTT CCT ACA AAG TTT Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe 200 205 210 215	738
ACG CCT AAC TGG CTT AGT GTC TTG GTA GAC AAT TTG CCT GGC ACC AAA Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys 220 225 230	786
GTA AAC GCA GAG AGT GTA GAG AGG ATA AAA CGG CAA CAC AGC TCA CAA Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser Ser Gln 235 240 245	834
GAA CAG ACT TTC CAG CTG CTG AAG TTA TGG AAA CAT CAA AAC AAA GCC Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn Lys Ala 250 255 260	882
CAA GAT ATA GTC AAG AAG ATC ATC CAA GAT ATT GAC CTC TGT GAA AAC Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn 265 270 275	930
AGC GTG CAG CGG CAC ATT GGA CAT GCT AAC CTC ACC TTC GAG CAG CTT Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu 280 285 290 295	978
CGT AGC TTG ATG GAA AGC TTA CCG GGA AAG AAA GTG GGA GCA GAA GAC Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp 300 305 310	1026
ATT GAA AAA ACA ATA AAG GCA TGC AAA CCC AGT GAC CAG ATC CTG AAG Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys 315 320 325	1074
CTG CTC AGT TTG TGG CGA ATA AAA AAT GGC GAC CAA GAC ACC TTG AAG Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys 330 335 340	1122

Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile
1 5 10 15

Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
20 25 30

Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr
 35 40 45
 Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro
 50 55 60
 Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
 65 70 75 80
 Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu
 85 90 95
 Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr
 100 105 110
 Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe
 115 120 125
 Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg
 130 135 140
 Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
 145 150 155 160
 Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys
 165 170 175
 Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr
 180 185 190
 Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
 195 200 205
 Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val
 210 215 220
 Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile
 225 230 235 240
 Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu
 245 250 255
 Trp Lys His Gln Asn Lys Ala Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln
 260 265 270
 Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala
 275 280 285
 Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly
 290 295 300
 Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys
 305 310 315 320

[illegible]

配列番号：1 2 6

配列の特徴

配列の長さ： 1 3 9 アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：126

Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys
1 5 10 15
Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro
20 25 30

Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys
1 5 10 15
Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro
20 25 30

Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala
 35 40 45
 Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys
 50 55 60
 Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr
 65 70 75 80
 Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn
 85 90 95
 Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His
 100 105 110
 Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly
 115 120 125
 Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys
 130 135

配列番号：1 2 7

配列の特徴

配列の長さ：48塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：1 2 7

CCGGCGGACA TTTATCACAC AGCAGCTGAT GAGAAGTTTC TTCATCCA

48

配列番号：1 2 8

配列の特徴

配列の長さ：219 アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：128

```

Met Leu Gly Ile Trp Thr Leu Leu Pro Leu Val Leu Thr Ser Val Ala
1      5      10      15
Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser
      20      25      30
Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn
      35      40      45
Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro
      50      55      60
Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro
      65      70      75      80
Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His
      85      90      95
Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
      100      105      110
Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg
      115      120      125
Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp
      130      135      140
Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr
      145      150      155      160

```



```

Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Asn Leu Gly Trp
      165                      170                      175
Leu Cys Leu Leu Leu Leu Pro Ile Pro Leu Ile Val Trp Val Lys Arg
      180                      185                      190
Lys Glu Val Gln Lys Thr Cys Arg Lys His Arg Lys Glu Asn Gln Gly
      195                      200                      205
Ser His Glu Ser Pro Thr Leu Asn Pro Glu Thr
      210                      215

```

配列番号：129

配列の特徴

配列の長さ：280アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：129

```

Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu
 1                      5                      10                      15
Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro
      20                      25                      30
His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys
      35                      40                      45
Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys
      50                      55                      60
Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
      65                      70                      75                      80

```

Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu
 85 90 95
 Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val
 100 105 110
 Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg
 115 120 125
 Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe
 130 135 140
 Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 145 150 155 160
 Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu
 165 170 175

 Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr
 180 185 190
 Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser
 195 200 205
 Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu
 210 215 220
 Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 225 230 235 240
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu
 245 250 255
 Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser
 260 265 270
 Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr
 275 280

配列番号：130

配列の特徴

配列の長さ：207アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：130

Met	Leu	Arg	Leu	Ile	Ala	Leu	Leu	Val	Cys	Val	Val	Tyr	Val	Tyr	Gly	1	5	10	15
Asp	Asp	Val	Pro	Tyr	Ser	Ser	Asn	Gln	Gly	Lys	Cys	Gly	Gly	His	Asp	20	25	30	
Tyr	Glu	Lys	Asp	Gly	Leu	Cys	Cys	Ala	Ser	Cys	His	Pro	Gly	Phe	Tyr	35	40	45	
Ala	Ser	Arg	Leu	Cys	Gly	Pro	Gly	Ser	Asn	Thr	Val	Cys	Ser	Pro	Cys	50	55	60	
Glu	Asp	Gly	Thr	Phe	Thr	Ala	Ser	Thr	Asn	His	Ala	Pro	Ala	Cys	Val	65	70	75	80
Ser	Cys	Arg	Gly	Pro	Cys	Thr	Gly	His	Leu	Ser	Glu	Ser	Gln	Pro	Cys	85	90	95	
Asp	Arg	Thr	His	Asp	Arg	Val	Cys	Asn	Cys	Ser	Thr	Gly	Asn	Tyr	Cys	100	105	110	
Leu	Leu	Lys	Gly	Gln	Asn	Gly	Cys	Arg	Ile	Cys	Ala	Pro	Gln	Thr	Lys	115	120	125	
Cys	Pro	Ala	Gly	Tyr	Gly	Val	Ser	Gly	His	Thr	Arg	Ala	Gly	Asp	Thr	130	135	140	
Leu	Cys	Glu	Lys	Cys	Pro	Pro	His	Thr	Tyr	Ser	Asp	Ser	Leu	Ser	Pro	145	150	155	160

```

Thr Glu Arg Cys Gly Thr Ser Phe Asn Tyr Ile Ser Val Gly Phe Asn
      165                      170                      175
Leu Tyr Pro Val Asn Glu Thr Ser Cys Thr Thr Thr Ala Gly His Asn
      180                      185                      190
Glu Val Ile Lys Thr Lys Glu Phe Thr Val Thr Leu Asn Tyr Thr
      195                      200                      205

```

配列番号：1 3 1

配列の特徴

配列の長さ：2 2 7 アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：1 3 1

```

Met Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala Val Gly Leu Glu Leu
1      5      10      15
Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr
      20      25      30
Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln
      35      40      45
Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys
      50      55      60
Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp
      65      70      75      80
Ser Thr Tyr Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys
      85      90      95

```

```

Gly Ser Arg Cys Ser Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg
      100                      105                      110
Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu
      115                      120                      125
Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg
      130                      135                      140
Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val
      145                      150                      155                      160
Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr
      165                      170                      175
Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly
      180                      185                      190
Asn Ala Ser Arg Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser
      195                      200                      205
Met Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser
      210                      215                      220
Gln His Thr
      225

```

配列番号：132

配列の特徴

配列の長さ：197アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：132

```

Met Val Ser Leu Pro Arg Leu Cys Ala Leu Trp Gly Cys Leu Leu Thr
1          5          10          15

```

Ala Val His Leu Gly Gln Cys Val Thr Cys Ser Asp Lys Gln Tyr Leu
 20 25 30
 His Asp Gly Gln Cys Cys Asp Leu Cys Gln Pro Gly Ser Arg Leu Thr
 35 40 45
 Ser His Cys Thr Ala Leu Glu Lys Thr Gln Cys His Pro Cys Asp Ser
 50 55 60
 Gly Glu Phe Ser Ala Gln Trp Asn Arg Glu Ile Arg Cys His Gln His
 65 70 75 80
 Arg His Cys Glu Pro Asn Gln Gly Leu Arg Val Lys Lys Glu Gly Thr
 85 90 95
 Ala Glu Ser Asp Thr Val Cys Thr Cys Lys Glu Gly Gln His Cys Thr
 100 105 110
 Ser Lys Asp Cys Glu Ala Cys Ala Gln His Thr Pro Cys Ile Pro Gly
 115 120 125
 Phe Gly Val Met Glu Met Ala Thr Glu Thr Thr Asp Thr Val Cys His
 130 135 140
 Pro Cys Pro Val Gly Phe Phe Ser Asn Gln Ser Ser Leu Phe Glu Lys
 145 150 155 160
 Cys Tyr Pro Trp Thr Ser Cys Glu Asp Lys Asn Leu Glu Val Leu Gln
 165 170 175
 Lys Gly Thr Ser Gln Thr Asn Val Ile Cys Gly Leu Lys Ser Arg Met
 180 185 190
 Arg Ala Leu Leu Val
 195

配列番号：1 3 3

配列の特徴

配列の長さ：208 アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：133

```

Met Asn Lys Trp Leu Cys Cys Ala Leu Leu Val Phe Leu Asp Ile Ile
 1           5           10           15

Glu Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp
      20           25           30

Pro Glu Thr Gly Arg Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Ala Pro Gly Thr
      35           40           45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Val Arg Arg Lys Thr Leu Cys Val Pro
      50           55           60

Cys Pro Asp Tyr Ser Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys
      65           70           75           80

Val Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Thr Val Lys Gln Glu
      85           90           95

Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Glu Glu Gly Arg Tyr
      100          105          110

Leu Glu Leu Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Leu
      115          120          125

Gly Val Leu Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg
      130          135          140

Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Gly Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys
      145          150          155          160

Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Ser Leu Gly Leu Leu Leu Ile Gln Lys
      165          170          175

Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr
      180          185          190

Gln Asn Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg
      195          200          205

```

配列番号：134

配列の特徴

配列の長さ：224アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：134

```

Met Gly Ala Gly Ala Thr Gly Arg Ala Met Asp Gly Pro Arg Leu Leu
1           5           10           15

Leu Leu Leu Leu Leu Gly Val Ser Leu Gly Gly Ala Lys Glu Ala Cys
20           25           30

Pro Thr Gly Leu Tyr Thr His Ser Gly Glu Cys Cys Lys Ala Cys Asn
35           40           45

Leu Gly Glu Gly Val Ala Gln Pro Cys Gly Ala Asn Gln Thr Val Cys
50           55           60

Glu Pro Cys Leu Asp Ser Val Thr Phe Ser Asp Val Val Ser Ala Thr
65           70           75           80

Glu Pro Cys Lys Pro Cys Thr Glu Cys Val Gly Leu Gln Ser Met Ser
85           90           95

Ala Pro Cys Val Glu Ala Asp Asp Ala Val Cys Arg Cys Ala Tyr Gly
100          105          110

Tyr Tyr Gln Asp Glu Thr Thr Gly Arg Cys Glu Ala Cys Arg Val Cys
115          120          125

Glu Ala Gly Ser Gly Leu Val Phe Ser Cys Gln Asp Lys Gln Asn Thr
130          135          140

Val Cys Glu Glu Cys Pro Asp Gly Thr Tyr Ser Asp Glu Ala Asn His
145          150          155          160

Val Asp Pro Cys Leu Pro Cys Thr Val Cys Glu Asp Thr Glu Arg Gln
165          170          175

```


Leu Arg Glu Cys Thr Arg Trp Ala Asp Ala Glu Cys Glu Glu Ile Pro
 180 185 190
 Gly Arg Trp Ile Thr Arg Ser Thr Pro Pro Glu Gly Ser Asp Ser Thr
 195 200 205
 Ala Pro Ser Thr Gln Glu Pro Glu Ala Pro Pro Glu Gln Asp Leu Ile
 210 215 220

配列番号：1 3 5

配列の特徴

配列の長さ：205 アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：1 3 5

Met Tyr Val Trp Val Gln Gln Pro Thr Ala Phe Leu Leu Leu Gly Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Gly Val Thr Val Lys Leu Asn Cys Val Lys Asp Thr Tyr Pro
 20 25 30
 Ser Gly His Lys Cys Cys Arg Glu Cys Gln Pro Gly His Gly Met Val
 35 40 45
 Ser Arg Cys Asp His Thr Arg Asp Thr Val Cys His Pro Cys Glu Pro
 50 55 60
 Gly Phe Tyr Asn Glu Ala Val Asn Tyr Asp Thr Cys Lys Gln Cys Thr
 65 70 75 80
 Gln Cys Asn His Arg Ser Gly Ser Glu Leu Lys Gln Asn Cys Thr Pro
 85 90 95

```

Thr Glu Asp Thr Val Cys Gln Cys Arg Pro Gly Thr Gln Pro Arg Gln
      100                      105                      110
Asp Ser Ser His Lys Leu Gly Val Asp Cys Val Pro Cys Pro Pro Gly
      115                      120                      125
His Phe Ser Pro Gly Ser Asn Gln Ala Cys Lys Pro Trp Thr Asn Cys
      130                      135                      140
Thr Leu Ser Gly Lys Gln Ile Arg His Pro Ala Ser Asn Ser Leu Asp
      145                      150                      155                      160
Thr Val Cys Glu Asp Arg Ser Leu Leu Ala Thr Leu Leu Trp Glu Thr
      165                      170                      175
Gln Arg Thr Thr Phe Arg Pro Thr Thr Val Pro Ser Thr Thr Val Trp
      180                      185                      190
Pro Arg Thr Ser Gln Leu Pro Ser Thr Pro Thr Leu Val
      195                      200                      205

```

配列番号：1 3 6

配列の特徴

配列の長さ：191 アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：1 3 6

```

Met Gly Asn Asn Cys Tyr Asn Val Val Val Ile Val Leu Leu Leu Val
1                      5                      10                      15
Gly Cys Glu Lys Val Gly Ala Val Gln Asn Ser Cys Asp Asn Cys Gln
      20                      25                      30
Pro Gly Thr Phe Cys Arg Lys Tyr Asn Pro Val Cys Lys Ser Cys Pro
      35                      40                      45

```

```

Pro Ser Thr Phe Ser Ser Ile Gly Gly Gln Pro Asn Cys Asn Ile Cys
 50                      55                      60

Arg Val Cys Ala Gly Tyr Phe Arg Phe Lys Lys Phe Cys Ser Ser Thr
 65                      70                      75                      80

His Asn Ala Glu Cys Glu Cys Ile Glu Gly Phe His Cys Leu Gly Pro
      85                      90                      95

Gln Cys Thr Arg Cys Glu Lys Asp Cys Arg Pro Gly Gln Glu Leu Thr
      100                      105                      110

Lys Gln Gly Cys Lys Thr Cys Ser Leu Gly Thr Phe Asn Asp Gln Asn
      115                      120                      125

Gly Thr Gly Val Cys Arg Pro Trp Thr Asn Cys Ser Leu Asp Gly Arg
      130                      135                      140

Ser Val Leu Lys Thr Gly Thr Thr Glu Lys Asp Val Val Cys Gly Pro
      145                      150                      155                      160

Pro Val Val Ser Phe Ser Pro Ser Thr Thr Ile Ser Val Thr Pro Glu
      165                      170                      175

Gly Gly Pro Gly Gly His Ser Leu Gln Val Leu Thr Leu Phe Leu
      180                      185                      190

```

配列番号：137

配列の特徴

配列の長さ：54塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：137

TAIGGATGAA GAAACTTCTC ATCAGCTGCT GTGTGATAAA TGTCCGCCGG GTAC

配列番号：138

配列の特徴

配列の長さ：380アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：138

Glu	Thr	Leu	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His	Tyr	Asp	Pro	Glu	Thr	Gly	His	1	5	10	15
Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Ala	Pro	Gly	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	His	20	25	30	
Cys	Thr	Val	Arg	Arg	Lys	Thr	Leu	Cys	Val	Pro	Cys	Pro	Asp	His	Ser	35	40	45	
Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His	Thr	Ser	Asp	Glu	Cys	Val	Tyr	Cys	Ser	Pro	50	55	60	
Val	Cys	Lys	Glu	Leu	Gln	Ser	Val	Lys	Gln	Glu	Cys	Asn	Arg	Thr	His	65	70	75	80
Asn	Arg	Val	Cys	Glu	Cys	Glu	Glu	Gly	Arg	Tyr	Leu	Glu	Ile	Glu	Phe	85	90	95	
Cys	Leu	Lys	His	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Ser	Gly	Val	Val	Gln	Ala	100	105	110	
Gly	Thr	Pro	Glu	Arg	Asn	Thr	Val	Cys	Lys	Lys	Cys	Pro	Asp	Gly	Phe	115	120	125	
Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	Cys	Ile	Lys	His	Thr	Asn	130	135	140	
Cys	Ser	Thr	Phe	Gly	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Lys	Gly	Asn	Ala	Thr	His	145	150	155	160

Asp Asn Val Cys Ser Gly Asn Arg Glu Ala Thr Gln Lys Cys Gly Ile
 165 170 175

Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr
 180 185 190

Lys Ile Ile Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Ser Leu Pro Gly
 195 200 205

Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Arg His Ser
 210 215 220

Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn
 225 230 235 240

Arg Asp Gln Glu Met Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys
 245 250 255

Glu Ser Ser Val Gln Arg His Leu Gly His Ser Asn Leu Thr Thr Glu
 260 265 270

Gln Leu Leu Ala Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Ile Ser Pro
 275 280 285

Glu Glu Ile Glu Arg Thr Arg Lys Thr Cys Lys Ser Ser Glu Gln Leu
 290 295 300

Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr
 305 310 315 320

Leu Lys Gly Leu Met Tyr Ala Leu Lys His Leu Lys Thr Ser His Phe
 325 330 335

Pro Lys Thr Val Thr His Ser Leu Arg Lys Thr Met Arg Phe Leu His
 340 345 350

Ser Phe Thr Met Tyr Arg Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile
 355 360 365

Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu
 370 375 380

配列番号：139

配列の特徴

配列の長さ：380アミノ酸

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：139

Glu	Thr	Phe	Pro	Pro	Lys	Tyr	Leu	His	Tyr	Asp	Glu	Glu	Thr	Ser	His	1	5	10	15
Gln	Leu	Leu	Cys	Asp	Lys	Cys	Pro	Pro	Gly	Thr	Tyr	Leu	Lys	Gln	His	20	25	30	
Cys	Thr	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr	Val	Cys	Ala	Pro	Cys	Pro	Asp	His	Tyr	35	40	45	
Tyr	Thr	Asp	Ser	Trp	His	Thr	Ser	Asp	Glu	Cys	Leu	Tyr	Cys	Ser	Pro	50	55	60	
Val	Cys	Lys	Glu	Leu	Gln	Tyr	Val	Lys	Gln	Glu	Cys	Asn	Arg	Thr	His	65	70	75	80
Asn	Arg	Val	Cys	Glu	Cys	Lys	Glu	Gly	Arg	Tyr	Leu	Glu	Ile	Glu	Phe	85	90	95	
Cys	Leu	Lys	His	Arg	Ser	Cys	Pro	Pro	Gly	Phe	Gly	Val	Val	Gln	Ala	100	105	110	
Gly	Thr	Pro	Glu	Arg	Asn	Thr	Val	Cys	Lys	Arg	Cys	Pro	Asp	Gly	Phe	115	120	125	
Phe	Ser	Asn	Glu	Thr	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	Cys	Arg	Lys	His	Thr	Asn	130	135	140	
Cys	Ser	Val	Phe	Gly	Leu	Leu	Leu	Thr	Gln	Lys	Gly	Asn	Ala	Thr	His	145	150	155	160
Asp	Asn	Ile	Cys	Ser	Gly	Asn	Ser	Glu	Ser	Thr	Gln	Lys	Cys	Gly	Ile	165	170	175	

Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg Phe Ala Val Pro Thr
 180 185 190
 Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val Asp Asn Leu Pro Gly
 195 200 205
 Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile Lys Arg Gln His Ser
 210 215 220
 Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu Trp Lys His Gln Asn
 225 230 235 240
 Lys Ala Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln Asp Ile Asp Leu Cys
 245 250 255
 Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala Asn Leu Thr Phe Glu
 260 265 270
 Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly Lys Lys Val Gly Ala
 275 280 285
 Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys Pro Ser Asp Gln Ile
 290 295 300
 Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn Gly Asp Gln Asp Thr
 305 310 315 320
 Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser Lys Thr Tyr His Phe
 325 330 335
 Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr Ile Arg Phe Leu His
 340 345 350
 Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu Phe Leu Glu Met Ile
 355 360 365
 Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys Leu
 370 375 380

配列番号：140

配列の特徴

配列の長さ：30塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：1 4 0

TGGACCACCC AGAAGTACCT TCATTATGAC

30

配列番号：1 4 1

配列の特徴

配列の長さ：3 0 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：1 4 1

GTCATAATGA AGGTACTTCT GGGTGGTOCA

30

配列番号：1 4 2

配列の特徴

配列の長さ：3 1 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：142

GGACCACCCA GCTTCATTAT GACGAAGAAA C

31

配列番号：143

配列の特徴

配列の長さ：31塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：143

GTTTCTTCGT CATAATGAAG CTGGGTGGTC C

31

配列番号：144

配列の特徴

配列の長さ：29塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：1 4 4

GTGGACCACC CAGGACGAAG AAACCTCTC

29

配列番号：1 4 5

配列の特徴

配列の長さ：2 9 塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：c D N A

配列の記載：配列番号：1 4 5

GAGAGGTTTC TTCGTCCTGG GTGGTCCAC

29

配列番号：1 4 6

配列の特徴

配列の長さ：29塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：146

CGTTTCCTCC AAAGTTCCTT CATTATGAC

29

配列番号：147

配列の特徴

配列の長さ：29塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：147

GTCATAATGA AGGAACTTTG GAGGAAACG

29

配列番号：148

配列の特徴

配列の長さ：32塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：148

GGAAACGTTT CCTGCAAAGT ACCTTCATTA TG

32

配列番号：149

配列の特徴

配列の長さ：32塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：149

CATAATGAAG GTACTTTGCA GGAAACGTTT CC

32

配列番号：150

配列の特徴

配列の長さ：27塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：150

CACGCAAAAG TCGGGAATAG ATGTCAC

27

配列番号：151

配列の特徴

配列の長さ：27塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：151

GTGACATCTA TTCCCGACTT TTGCGTG

27

配列番号：152

配列の特徴

配列の長さ：25塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：152

CACCCTGTCG GAAGAGGCCT TCTTC

25

配列番号：153

配列の特徴

配列の長さ：25塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：153

GAAGAAGGCC TCTTCCGACA GGGTG

25

配列番号：154

配列の特徴

配列の長さ：24塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：154

TGACCTCTCG GAAAGCAGCG TGCA

24

配列番号：155

配列の特徴

配列の長さ：24塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：155

TGCACGCTGC TTTCCGAGAG GTCA

24

配列番号：156

配列の特徴

配列の長さ：24塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：156

CCTCGAAATC GAGCGAGCAG CTCC

24

配列番号：157

配列の特徴

配列の長さ：25塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：157

CGATTTGAG GTCTTTCTCG TTCTC

25

配列番号：158

配列の特徴

配列の長さ：33塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：158

CCGTGAAAAT AAGCTCGTTA TAACTAGGAA TGG

33

配列番号：159

配列の特徴

配列の長さ：33塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：159

CCATTCCTAG TTATAACGAG CTTATTTTCA CGG

33

配列番号：160

配列の特徴

配列の長さ：38塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：160

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG

38

配列番号：161

配列の特徴

配列の長さ：44塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：161

CCTCTCTCGA GTCAGGTGAC ATCTATTCCA CACTTTTGCG TGGC

44

配列番号：162

配列の特徴

配列の長さ：38塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：162

CCTCTGAGCT CAAGCTTCG AGGACCACAA TGAACAAG

38

配列番号：163

配列の特徴

配列の長さ：38塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：163

CCTCTCTCGA GTCAAGGAAC AGCAAACCTG AAGAAGGC

38

配列番号：164

配列の特徴

配列の長さ：38塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：164

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG

38

配列番号：165

配列の特徴

配列の長さ：38塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：165

CCTCTCTCGA GTCACCTCTGT GGTGAGGTTT GAGTGGCC

38

配列番号：166

配列の特徴

配列の長さ：38塩基対

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：166

CCTCTGAGCT CAAGCTTCCG AGGACCACAA TGAACAAG

38

配列番号：167

配列の特徴

配列の長さ：38塩基対

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

配列の記載：配列番号：167

CCTCTCTCGA GTCAGGATGT TTTCAAGTGC TTGAGGGC

38

配列番号：168

配列の特徴

配列の長さ：16アミノ酸

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

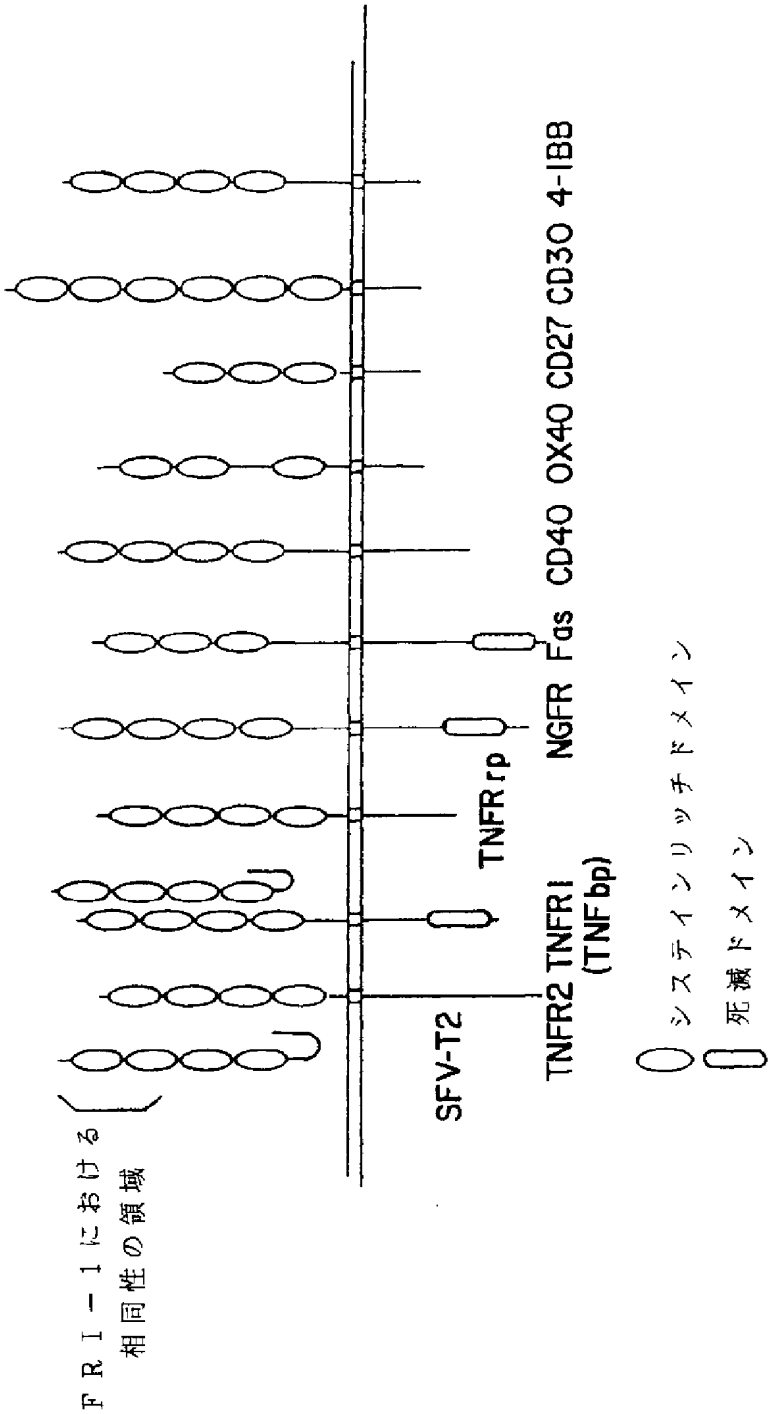
配列の種類：蛋白質

配列の記載：配列番号：168

Met	Lys	His	His	His	His	His	His	His	His	Ala	Ser	Val	Asn	Ala	Leu	Glu
1				5						10					15	

【図1】

FIG. 1C



【図2】

FIG.2A

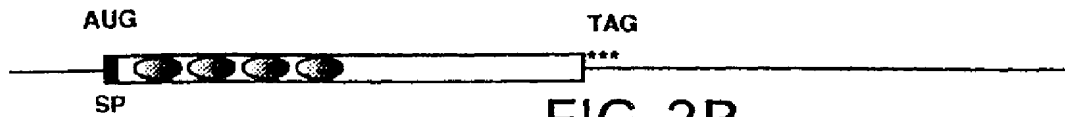


FIG.2B

```

      10              30              50
ATCAAAGGCAGGGCATACTTCCTGTTGCCAGACCTTATATAAAACGTCATGTTTCGCCTG
      70              90             110
GGCAGCAGAGAAGCACCTAGCACTGGCCAGCGGCTGCCGCCCTGAGGTTTCCAGAGGACC
     130             150             170
ACAATGAACAAGTGGCTGTGCTGTGCACTCCTGGTGTCTTGGACATCATTTGAATGGACA
      M  N  K  W  L  C  C  A  L  L  V  F  L  D  I  I  E  W  T
     190             210             230
ACCCAGGAAACCTTTCCTCCAAAATACTTGCAATTATGACCCAGAAACCGGACGTCAGCTC
      T  O  E  T  F  P  P  K  Y  L  H  Y  D  P  E  T  G  R  Q  L
     250             270             290
TTGTGTGACAAATGTGCTCCTGGCACCTTACCTAAACAGCACTGCACAGTCAGGAGGAAG
      L  C  D  K  C  A  P  G  T  Y  L  K  Q  H  C  T  V  R  R  K
     310             330             350
ACACTGTGTGTCCCTTGCCCTGACTACTCTTATACAGACAGCTGGCACACGAGTGATGAA
      T  L  C  V  P  C  P  D  Y  S  Y  T  D  S  W  H  T  S  D  E
     370             390             410
TGCGTGTAAGTGCAGCCCCGTGTGCAAGGAACTGCAGACCGTGAAACAGGACTGCAACCGC
      C  V  Y  C  S  P  V  C  K  E  L  Q  T  V  K  Q  E  C  N  R
     430             450             470
ACCCACAACCGAGTGTGCGAATGTGAGGAAGGGCGCTACCTGGAGCTCGAATTCTGCTTG
      T  H  N  R  V  C  E  C  E  E  G  R  Y  L  E  L  E  F  C  L
     490             510             530
AAGCACCGGAGCTGTCCCCCAGGCTTGGGTGTGCTGCAGGCTGGGACCCCAGAGCGAAAC
      K  H  R  S  C  P  P  G  L  G  V  L  Q  A  G  T  P  E  R  N
     550             570             590
ACGGTTTGCAAAAGATGTCCGGATGGGTTCCTTCTCAGGTGAGACGTCATCGAAAGCACCC
      T  V  C  K  R  C  P  D  G  F  F  S  G  E  T  S  S  K  A  P
     610             630             650
TGTAGGAAACACACCAACTGCAGCTCACTTGGCCTCCTGCTAATTCAGAAAGGAAATGCA
      C  R  K  H  T  N  C  S  S  L  G  L  L  L  I  Q  K  G  N  A
     670             690             710
ACACATGACAATGTATGTTCCGGAACAGAGAAGCAACTCAAAATTGTGGAATAGATGTC
      T  H  D  N  V  C  S  G  N  R  E  A  T  Q  N  C  G  I  D  V
     730             750             770
ACCCTGTGCGAAGAGGCATTCTTCAGGTTTGCTGTGCCTACCAAGATTATACCGAATTGG
      T  L  C  E  E  A  F  F  R  F  A  V  P  T  K  I  I  P  N  W
     790             810             830
CTGAGTGTTCCTGGTGGACAGTTTGCCTGGGACCAAAGTGAATGCAGAGAGTGTAGAGAGG
      L  S  V  L  V  D  S  L  P  G  T  K  V  N  A  E  S  V  E  R
     850             870             890
ATAAAACGGAGACACAGCTCGCAAGAGCAAACCTTCCAGCTACTTAAGCTGTGGAAGCAT
      I  K  R  R  H  S  S  Q  E  Q  T  F  Q  L  L  K  L  W  K  H
     910             930             950
CAAAACAGAGACCAGGAAATGGTGAAGAAGATCATCCAAGACATTGACCTCTGTGAAAGC
      Q  N  R  D  Q  E  M  V  K  K  I  I  Q  D  I  D  L  C  E  S
     970             990             1010
AGTGTGCAACGGCATATCGGCCACGCGAACCTCACCACAGAGCAGCTCCGCATCTTGATG
      S  V  Q  R  H  I  G  H  A  N  L  T  T  E  Q  L  R  I  L  M

```

【図2】

FIG.2C

```

      1030              1050              1070
GAGAGCTTGCCTGGGAAGAAGATCAGCCCAGACGAGATTGAGAGAACGAGAAAGACCTGC
E S L P G K K I S P D E I E R T R K T C
      1090              1110              1130
AAACCCAGCGAGCAGCTCCTGAAGCTACTGAGCTTGTGGAGGATCAAAAATGGAGACCAA
K P S E Q L L K L L S L W R I K N G D Q
      1150              1170              1190
GACACCTTGAAGGGCCTGATGTACGCACTCAAGCACTTGAAAGCATACCACTTTCCCAAA
D T L K G L M Y A L K H L K A Y H F P K
      1210              1230              1250
ACCGTCACCCACAGTCTGAGGAAGACCATCAGGTTCTTGCACAGCTTCACCATGTACCGA
T V T H S L R K T I R F L H S F T M Y R
      1270              1290              1310
TTGTATCAGAACTCTTTCTAGAAATGATAGGGAATCAGGTTCAATCAGTGAAGATAAGC
L Y Q K L F L E M I G N Q V Q S V K I S
      1330              1350              1370
TGCTTATAGTTAGGAATGGTCACTGGGCTGTTTCTTCAGGATGGGCCAACACTGATGGAG
C L
      1390              1410              1430
CAGATGGCTGCTTCTCCGGCTCTTGAAATGGCAGTTGATTCTTTCTCATCAGTTGGTGG
      1450              1470              1490
GAATGAAGATCCTCCAGCCCAACACACACTGGGGAGTCTGAGTCAGGAGAGTGAGGCA
      1510              1530              1550
GGCTATTTGATAATTGTGCAAAGCTGCCAGGTGTACACCTAGAAAGTCAAGCACCCCTGAG
      1570              1590              1610
AAAGAGGATATTTTTATAACCTCAAACATAGGCCCTTTCTTCCTCTCCTTATGGATGAG
      1630              1650              1670
TACTCAGAAGGCTTCTACTATCTTCTGTGTCATCCCTAGATGAAGGCCTCTTTTATTTAT
      1690              1710              1730
TTTTTTATTCTTTTTCGGAGCTGGGGACCGAACCCAGGGCCTTGCGCTTGCGAGGCAA
      1750              1770              1790
GTGCTCTACCACTGAGCTAAATCTCCAACCCCTGAAGGCCTCTTTCTTTCTGCCTCTGAT
      1810              1830              1850
AGTCTATGACATTCTTTTTTCTACAATTCGTATCAGGTGCACGAGCCTTATCCCATTTGT
      1870              1890              1910
AGGTTTCTAGGCAAGTTGACCGTTAGCTATTTTCCCTCTGAAGATTTGATTTCGAGTTGC
      1930              1950              1970
AGACTTGGCTAGACAAGCAGGGGTAGGTTATGGTAGTTTATTTAACAGACTGCCACCAGG
      1990              2010              2030
AGTCCAGTGTTTCTTGTTCCCTCTGTAGTTGTACCTAAGCTGACTCCAAGTACATTTAGTA
      2050              2070              2090
TGAAAAATAATCAACAAATTTTATTCTTCTATCAACATTGGCTAGCTTTGTTTCAGGGC
      2110              2130              2150
ACTAAAAGAACTACTATATGGAGAAAGAATTGATATTGCCCCCAACGTTCAACAACCCA
      2170              2190              2210
ATAGTTTATCCAGCTGTCATGCCTGGTTCAGTGTCTACTGACTATGCGCCCTCTTATTAC
      2230              2250              2270
TGCATGCAGTAATTCAACTGGAAATAGTAATAATAATAATAGAAATAAAATCTAGACTCC
      2290              2310              2330
ATTGGATCTCTCTGAATATGGGAATATCTAACTTAAGAAGCTTTGAGATTTTCAGTTGTGT
      2350              2370              2390
TAAAGGCTTTTATTAAAAAGCTGATGCTCTTCTGTAAAAGTTACTAATATATCTGTAAGA
      2410              2430
CTATTACAGTATTGCTATTTATATCCATCCAG

```

FIG. 2D

43	44	25	39	28	26	34	28	25	95	94	74	88	72	75	78	72	54	103	144	84	98	85	85	89	84	65
fas.frg	tnfr1.frg	sv-t2.frg	tnfr2.frg	cd40.frg	osteo.frg	ngfr.frg	ox40.frg	4lbb.frg	fas.frg	tnfr1.frg	sv-t2.frg	tnfr2.frg	cd40.frg	osteo.frg	ngfr.frg	ox40.frg	4lbb.frg	fas.frg	tnfr1.frg	sv-t2.frg	tnfr2.frg	cd40.frg	osteo.frg	ngfr.frg	ox40.frg	4lbb.frg
MGLGIW	MGLSTV	MGLSTV	MGLSTV	MGLSTV	MGLSTV	MGLSTV	MGLSTV	MGLSTV	TQNL	PQGL	GKCG	CRLE	KQYL	KQYL	GLYH	GLYH	GLYH	HE	HLRH	HLRH	HLRH	HLRH	HLRH	HLRH	HLRH	HLRH
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q	Q	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK	SK
LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	LL	GG	NS	KG	LD	Q	Q	Q	Q										

【図 3】

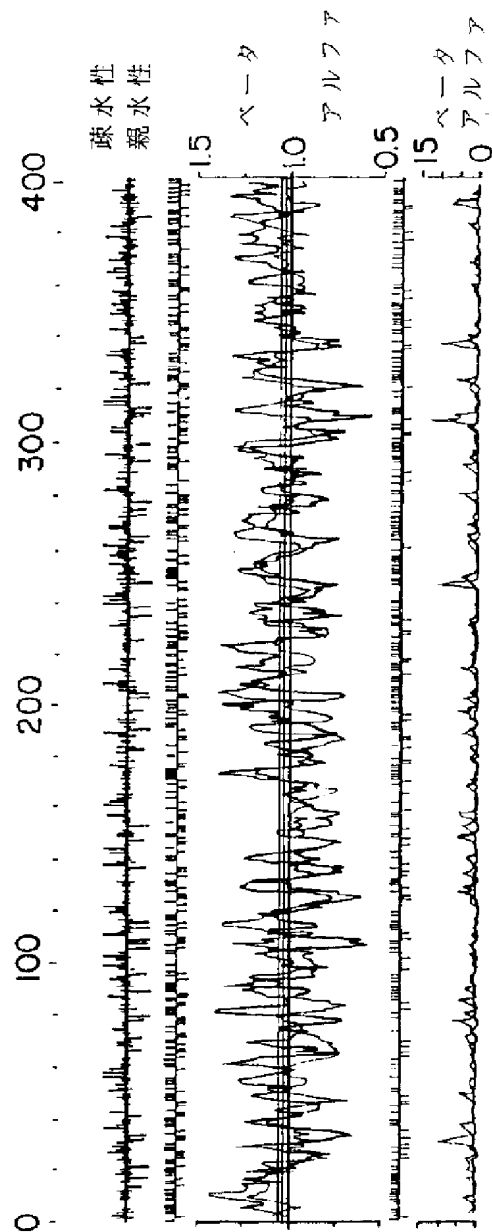


FIG. 3A

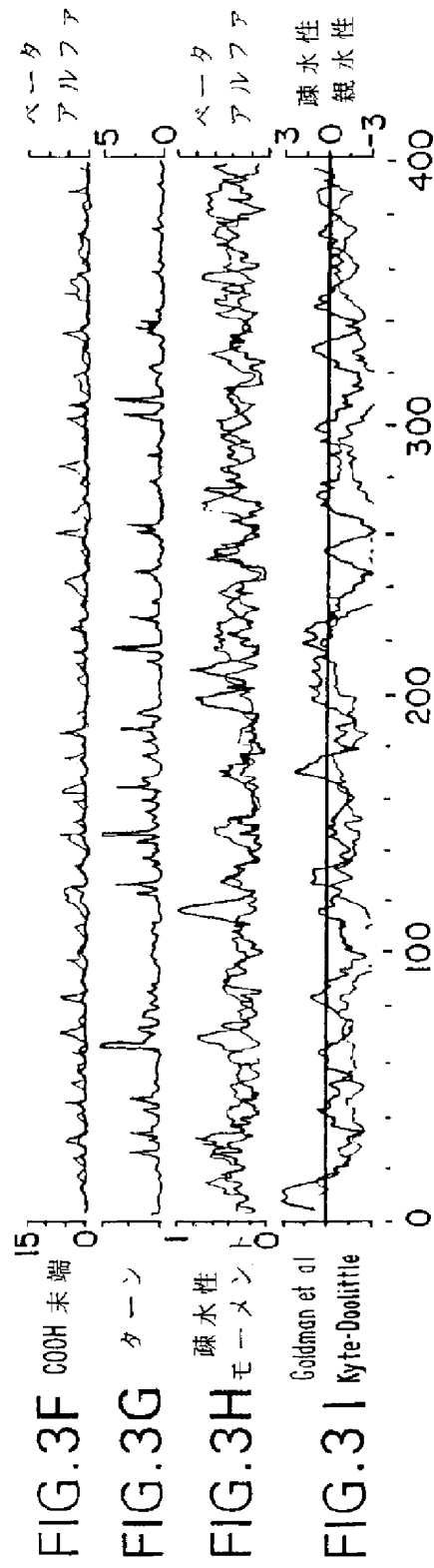
FIG. 3B

FIG. 3C

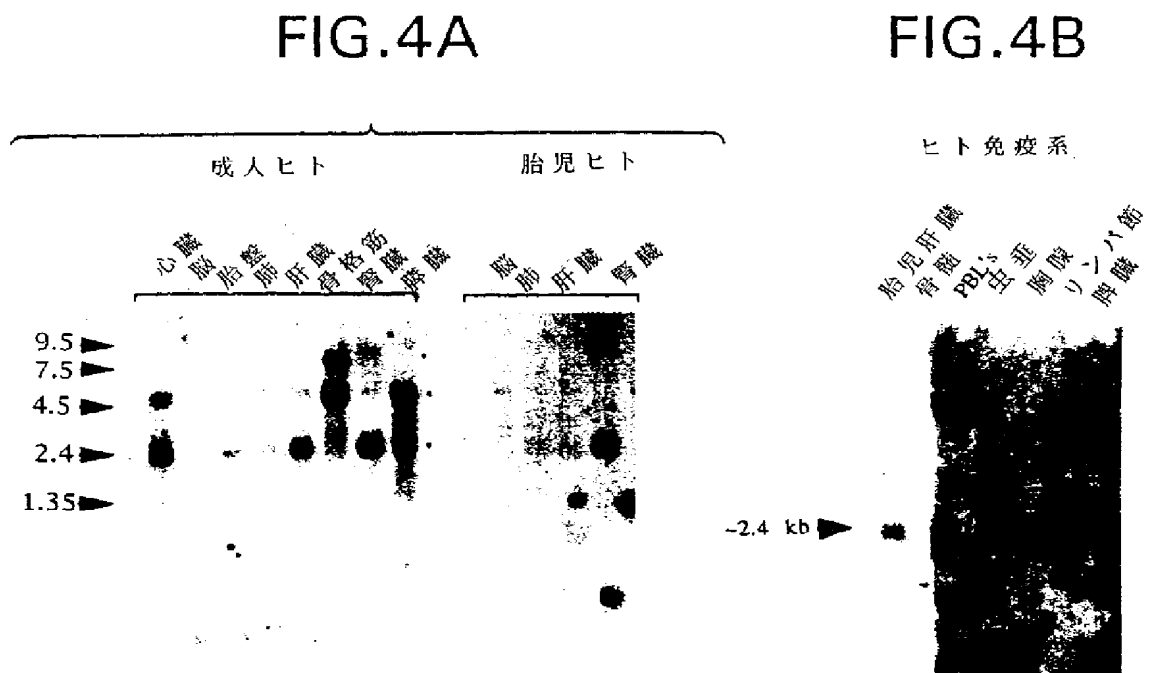
FIG. 3D

FIG. 3E

【図 3】

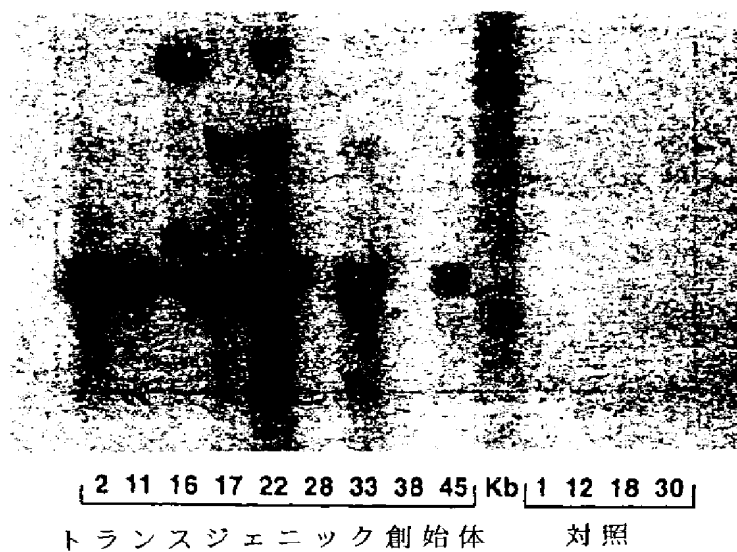


【図4】



【図5】

FIG.5



【図6】

FIG.6A

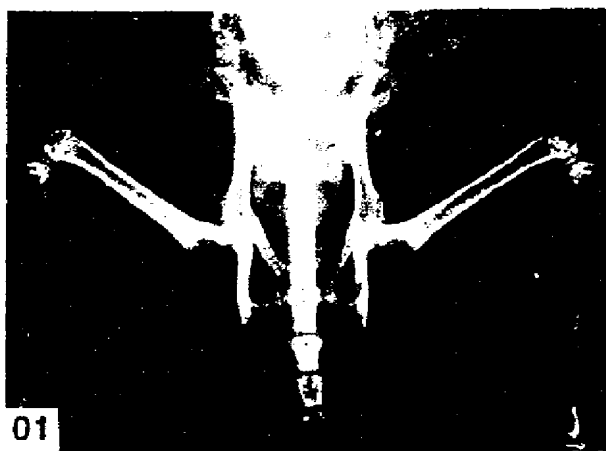


FIG.6B

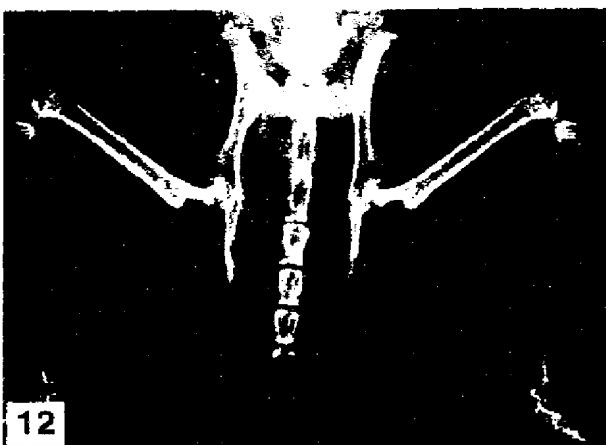


FIG.6C



【図6】

FIG.6D

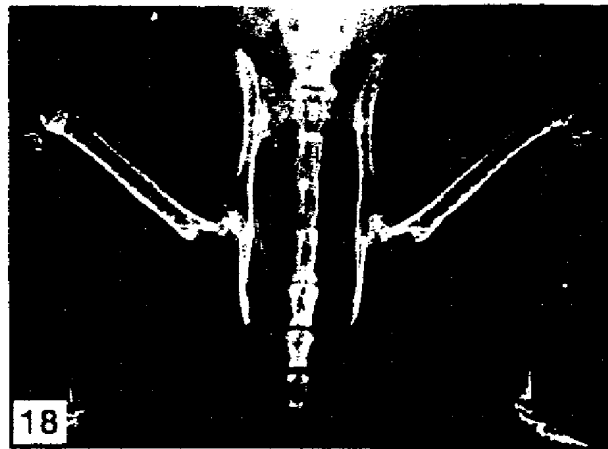
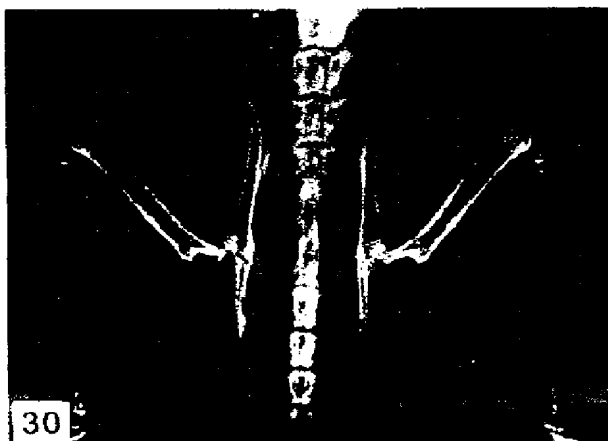


FIG.6E



FIG.6F

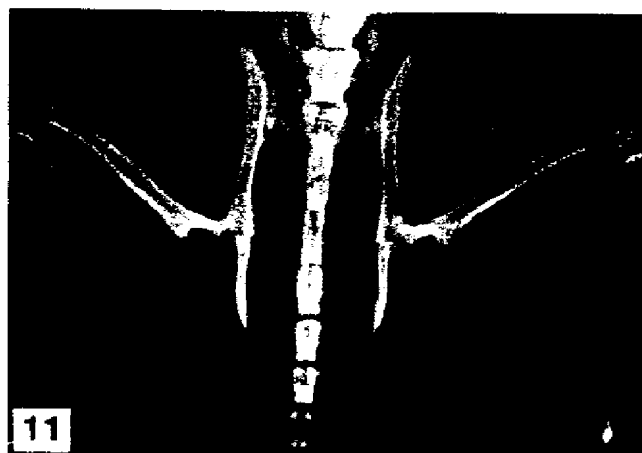


【図6】

FIG.6G



FIG.6H



【図6】

FIG.6I



FIG.6J



【図7】

FIG.7A

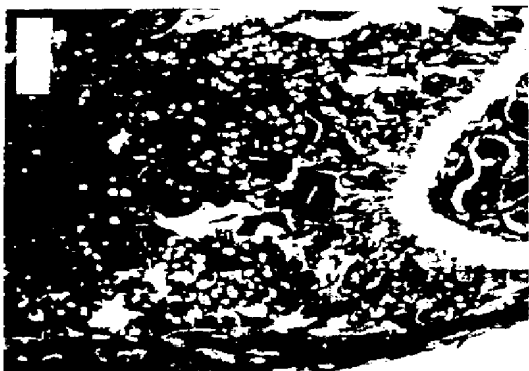


FIG.7B



FIG.7C

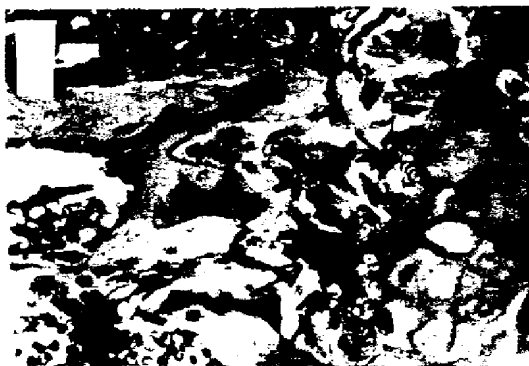
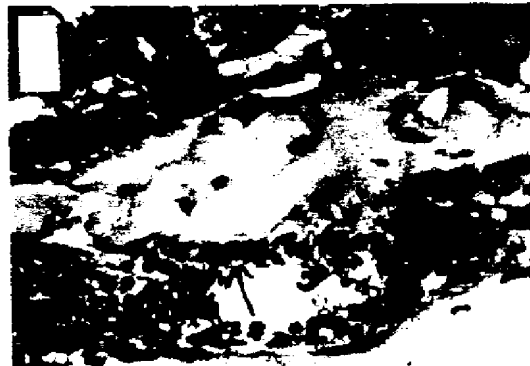


FIG.7D



【図7】

FIG.7E

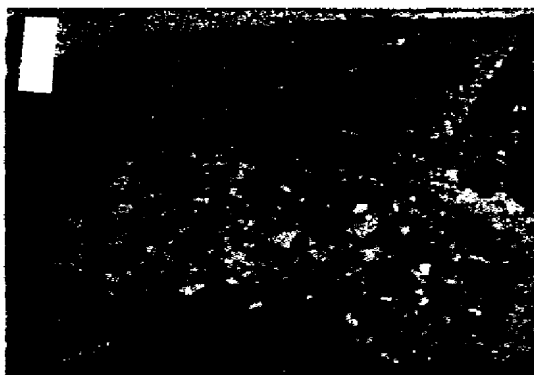


FIG.7F

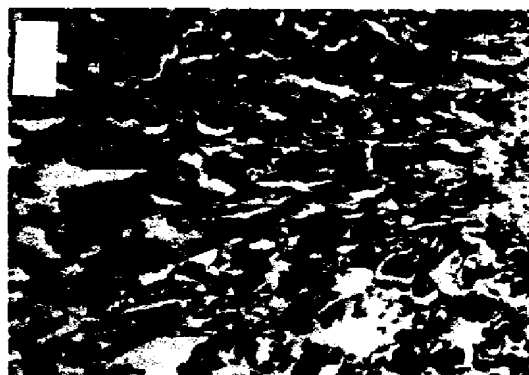


FIG.7G



FIG.7H



【図8】

FIG.8A



FIG.8B



FIG.8C

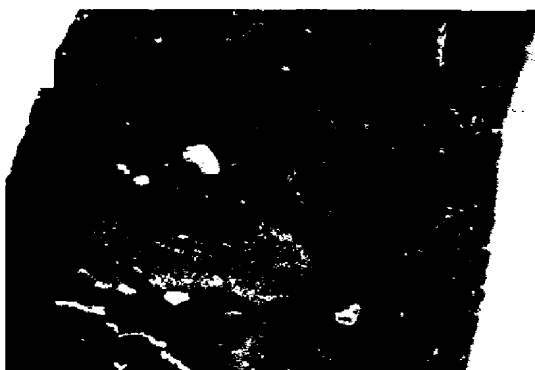


FIG.8D



【図9】

FIG.9A

```

      10              30              50
CCTTATATAARACGTCATGATTGCCTGGGCTGCAGAGACGCACCTAGCACTGACCCAGCG
      70              90              110
GCTGCCTCCTGAGGTTTCCCGAGGACCACAATGAACAAGTGGCTGTGCTGCGCACTCCTG
      130              150              170
      M N K W L C C A L L
GTGCTCCTGGACATCATTTGAATGGACAACCCAGGAAACCCCTTCCTCCAAAGTACTTGCAT
      190              210              230
      V L L D L L E W T T O E T L P P K Y L H
TATGACCCAGAACTGGTCATCAGCTCCTGTGTGACAAATGTGCTCCTGGCACCTACCTA
      250              270              290
Y D P E T G H Q L L C D K C A P G T Y L
AAACAGCACTGCACAGTGAGGAGGAAGACATTGTGTGTCCCTTGCCCTGACCACTCTTAT
      310              330              350
K Q H C T V R R K T L C V P C P D H S Y
ACGGACAGCTGGCACACCAAGTGATGAGTGTGTGTATTGCAGCCCAGTGTGCAAGGAAGTG
      370              390              410
T D S W H T S D E C V Y C S P V C K E L
CAGTCCGTGAAGCAGGAGTGCAACCGCACCCACAACCGAGTGTGTGAGTGTGAGGAAGGG
      430              450              470
Q S V K Q E C N R T H N R V C E C E E G
CGTTACCTGGAGATCGAATTCTGCTTGAAGCACCGGAGCTGTCCCCCGGGCTCCGGCGTG
      490              510              530
R Y L E I E F C L K H R S C P P G S G V
GTGCAAGCTGGAACCCCAGAGCGAAACACAGTTTGCAAAAAATGTCCAGATGGGTTCTTC
      550              570              590
V Q A G T P E R N T V C K K C P D G F F
TCAGGTGAGACTTCATCGAAAGCACCCCTGTATAAAACACACGAACTGCAGCACATTGGC
      610              630              650
S G E T S S K A P C I K H T N C S T F G
CTCCTGCTAATTCAGAAAGGAAATGCAACACATGACAACGTGTGTTCCGGAAACAGAGAA
      670              690              710
L L L I Q K G N A T H D N V C S G N R E
GCCACGCAAAAGTGTGGAATAGATGTCACCCTGTGTGAAGAGGCCTTCTTCAGGTTTGCT
      730              750              770
A T Q K C G I D V T L C E E A F F R F A
GTTCCCTACCAAGATTATACCAAATTGGCTGAGTGTTTTGGTGGACAGTTTGCCTGGGACC
      790              810              830
V P T K I I P N W L S V L V D S L P G T

```

【図9】

FIG.9B

```

      790              810              830
AAAGTGAATGCCGAGAGTGTAGAGAGGATAAAACGGAGACACAGCTCACAAAGAGCAAACC
K  V  N  A  E  S  V  E  R  I  K  R  R  H  S  S  Q  E  Q  T
      850              870              890
TTCCAGCTGCTGAAGCTGTGGAAACATCAAAACAGAGACCAGGAAATGGTGAAGAAGATC
F  Q  L  L  K  L  W  K  H  Q  N  R  D  Q  E  M  V  K  K  I
      910              930              950
ATCCAAGACATTGACCTCTGTGAAAGCAGCGTGCAGCGGCATCTCGGCCACTCGAACCTC
I  Q  D  I  D  L  C  E  S  S  V  Q  R  H  L  G  H  S  N  L
      970              990              1010
ACCACAGAGCAGCTTCTTGCCTTGATGGAGAGCCTGCCTGGGAAGAAGATCAGCCCAGAA
T  T  E  Q  L  L  A  L  M  E  S  L  P  G  K  K  I  S  P  E
      1030             1050             1070
GAGATTGAGAGAACGAGAAAGACCTGCAAATCGAGCGAGCAGCTCCTGAAGCTACTCAGT
E  I  E  R  T  R  K  T  C  K  S  S  E  Q  L  L  K  L  L  S
      1090             1110             1130
TTATGGAGGATCAAAAATGGTGACCAAGACACCTTGAAGGGCCTGATGTATGCCCTCAAG
L  W  R  I  K  N  G  D  Q  D  T  L  K  G  L  M  Y  A  L  K
      1150             1170             1190
CACTTGAAAAACATCCCACCTTTCCCAAAACTGTCACCACACAGTCTGAGGAAGACCATGAGG
H  L  K  T  S  H  F  P  K  T  V  T  H  S  L  R  K  T  M  R
      1210             1230             1250
TTCCTGCACAGCTTCACAAATGTACAGACTGTATCAGAAGCTCTTTTGTAGAAATGATAGGG
F  L  H  S  F  T  M  Y  R  L  Y  Q  K  L  F  L  E  M  I  G
      1270             1290             1310
AATCAGGTTCAATCCGTGAAAATAAGCTGCTTATAACTAGGAATGGTCACTGGGCTGTTT
N  Q  V  Q  S  V  K  I  S  C  L

CTTCA

```


【図9】

FIG.9C

```

      10              30              50
GTATATATAACGTGATGAGCGTACGGGTGCGGAGACGCACCGGAGCGCTCGCCCAGCCGC
      70              90              110
CGYC'TCCAAGCCCCCTGAGGTT'TCCGGGGACCACAATGAACAAGTTGCTGTGCTGCGCGCT
                        M N K L L C A L
      130              150              170
CG'TG'TT'TCTGGACATCTCCATTAAGTGGACCACCCAGGAAACGTTTCTCCAAAGTACCT
V F L D I S I K W T T Q E T F P P K Y L
      190              210              230
TCATTATGACGAAGAAACCTCTCATCAGCTGTTGTGTGACAAATGTCCTCCTGGTACCTA
H Y D E E T S H Q L L C D K C P P G T Y
      250              270              290
CCTAAAACAACACTGTACAGCAAAGTGAAGACCGTGTGCGCCCCTTGCCCTGACCACTA
L K Q H C T A K W K T V C A P C P D H Y
      310              330              350
CTACACAGACAGCTGGCACACCAGTGACGAGTGTCTATACTGCAGCCCCGTGTGCAAGGA
Y T D S W H T S D E C L Y C S P V C K E
      370              390              410
GCTGCAGTACGTCAAGCAGGAGTGAATCGCACCCACAACCGCGTGTGCGAATGCAAGGA
L Q Y V K Q E C N R T H N R V C E C K E
      430              450              470
AGGGCGCTACCTTGAGATAGAGTTCTGCTTGAAACATAGGAGCTGCCCTCCTGGATTTGG
G R Y L E I E F C L K H R S C P P G F G
      490              510              530
AGTGGTGCAAGCTGGAACCCCAAGAGCGAAATACAGTTTGCAAAAGATGTCCAGATGGGTT
V V Q A G T P E R N T V C K R C P D G F
      550              570              590
CTTCTCAAATGAGACGTCATCTAAAGCACCCCTGTAGAAAACACACAAATTGCAGTGTCTT
F S N E T S S K A P C R K H T N C S V F
      610              630              650
TGGTCTCCTGCTAACTCAGAAAGGAAATGCAACACACGACAACATATGTTCCCGAAACAG
G L L L T Q K G N A T H D N I C S G N S
      670              690              710
TGAATCAACTCAAAAATGTGGAATAGATGTTACCCTGTGTGAGGAGGCATTCTTCAGGTT
E S T Q K C G I D V T L C E E A F F R F
      730              750              770
TGCTGTTCTCTACAAAGTTTACGCCTAACTGGCTTAGTGTCTTGGTAGACAATTTGCCTGG
A V P T K F T P N W L S V L V D N L P G

```

【図9】

FIG.9D

```

      790              810              830
CACCAAAGTAAACGCAGAGAGTGTAGAGAGGATAAAACGGCAACACAGCTCACAAGAACA
T K V N A E S V E R I K R Q H S S Q E Q
      850              870              890
GACTTTCCAGCTGCTGAAGTTATGGAAACATCAAAACAAAGACCAAGATATAGTCAAGAA
T F Q L L K L W K H Q N K D Q D I V K K
      910              930              950
GATCATCCAAGATATTGACCTCTGTGAAAACAGCGTGCAGCGGCACATTGGACATGCTAA
I I Q D I D L C E N S V Q R H I G H A N
      970              990              1010
CCTCACCTTCGAGCAGCTTCGTAGCTTGATGGAAAGCTTACCGGGAAAGAAAGTGGGAGC
L T F E Q L R S L M E S L P G K K V G A
      1030             1050             1070
AGAAGACATTGAAAAACAATAAAGGCATGCAAACCCAGTGACCAGATCCTGAAGCTGCT
E D I E K T I K A C K P S D Q I L K L L
      1090             1110             1130
CAGTTTGTGGCGAATAAAAAATGGCGACCAAGACACCTTGAAGGGCCTAATGCACGCACT
S L W R I K N G D Q D T L K G L M H A L
      1150             1170             1190
AAAGCACTCAAAGACGTACCACCTTTCCCAAACCTGTCACTCAGAGTCTAAAGAAGACCAT
K H S K T Y H F P K T V T Q S L K K T I
      1210             1230             1250
CAGGTTCCCTTCACAGCTTCACAATGTACAAATTGTATCAGAAGTTATTTTAGAAATGAT
R F L H S F T M Y K L Y Q K L F L E M I
      1270             1290             1310
AGGTAACCAGGTCCAATCAGTAAAAATAAGCTGCTTATAACTGGAAATGGCCATTGAGCT
G N Q V Q S V K I S C L
      1330             1350
GTTTCCTCACAATTGGCGAGATCCCATGGATGATAA

```

FIG.9E

muosteo.fig	M	N	K	W	L	C	C	A	L	L	V	L	L	D	I	I	E	W	T	T	Q	E	T	L	P	P	K	Y	L	H	Y	D	P	E	T	G	H	Q	L	L	C	D	K	C	A	P	G	T	Y	L	50	
ratosteo.fig	M	N	K	W	L	C	C	A	L	L	V	F	L	D	I	I	E	W	T	T	Q	E	T	F	P	P	K	Y	L	H	Y	D	P	E	T	G	R	Q	L	L	C	D	K	C	A	P	G	T	Y	L	50	
huosteo.fig	M	N	K	L	L	C	C	A	L	V	F	L	D	I	S	I	K	W	T	T	Q	E	T	F	P	P	K	Y	L	H	Y	D	E	E	T	S	H	Q	L	L	C	D	K	C	P	E	G	T	Y	L	50	
muosteo.fig	K	Q	H	C	T	V	R	R	K	T	L	C	V	P	C	P	D	H	S	Y	T	D	S	W	H	T	S	D	E	C	V	Y	C	S	P	V	C	K	E	L	Q	S	V	K	Q	E	C	N	R	T	100	
ratosteo.fig	K	Q	H	C	T	V	R	R	K	T	L	C	V	P	C	P	D	I	S	Y	T	D	S	W	H	T	S	D	E	C	V	Y	C	S	P	V	C	K	E	L	Q	T	V	K	Q	E	C	N	R	T	100	
huosteo.fig	K	Q	H	C	T	A	K	W	K	T	V	C	A	P	C	P	D	H	Y	Y	T	D	S	W	H	T	S	D	E	C	L	Y	C	S	P	V	C	K	E	L	Q	T	V	K	Q	E	C	N	R	T	100	
muosteo.fig	H	N	R	V	C	E	C	E	E	G	R	Y	L	E	I	E	F	C	L	K	H	R	S	C	P	P	G	L	S	G	V	V	Q	A	G	T	P	E	R	N	T	V	C	K	K	C	P	D	G	F	F	150
ratosteo.fig	H	N	R	V	C	E	C	E	E	G	R	Y	L	E	L	E	F	C	L	K	H	R	S	C	P	P	G	L	G	V	L	Q	A	G	T	P	E	R	N	T	V	C	K	R	C	P	D	G	F	F	150	
huosteo.fig	H	N	R	V	C	E	C	K	E	G	R	Y	L	E	I	E	F	C	L	K	H	R	S	C	P	P	G	F	G	V	Q	A	G	T	P	E	R	N	T	V	C	K	R	C	P	D	G	F	F	150		
muosteo.fig	S	G	E	T	S	S	K	A	P	C	I	K	H	T	N	C	S	T	F	G	L	L	L	I	Q	K	G	N	A	T	H	D	N	V	C	S	G	N	R	E	A	T	Q	K	C	G	I	D	V	T	200	
ratosteo.fig	S	G	E	T	S	S	K	A	P	C	R	K	H	T	N	C	S	S	L	G	L	L	L	I	Q	K	G	N	A	T	H	D	N	V	C	S	G	N	R	E	A	T	Q	N	C	G	I	D	V	T	200	
huosteo.fig	S	N	E	T	S	S	K	A	P	C	R	K	H	T	N	C	S	V	F	G	L	L	L	T	Q	K	G	N	A	T	H	D	N	I	C	S	G	N	S	E	S	T	Q	K	C	G	I	D	V	T	200	

FIG.9F

muosteo.frg	LCEEAFFRFAVETKIIIPNWLSVLVDSLPGLTKVNAEESVERIKRRRHSSSQEQT	250
ratosteo.frg	LCEEAFFRFAVETKIIIPNWLSVLVDSLPGLTKVNAEESVERIKRRRHSSSQEQT	250
huosteo.frg	LCEEAFFRFAVETKFTTPNWLSVLVDNLPGLTKVNAEESVERIKRRQHSSSQEQT	250
muosteo.frg	FQLLKLWKHQNRDQEMVKKIIQDIDLCESSVQRRLGHSNLTTTEQLLALME	300
ratosteo.frg	FQLLKLWKHQNRDQEMVKKIIQDIDLCESSVQRRLGHANLTTTEQLRLIME	300
huosteo.frg	FQLLKLWKHQNRDQDITVKKIIQDIDLCEINSSVQRRLGHANLTFEQRLRS	300
muosteo.frg	SLPGKKISPDEIERTRKKTCKKSISEQLLKLKLLSLWRIKNGDQDTLKGLMYALK	350
ratosteo.frg	SLPGKKISPDEIERTRKKTCKKPSEQLLKLKLLSLWRIKNGDQDTLKGLMYALK	350
huosteo.frg	SLPGKKVGAEDIEKTTKACKPSDQTLLKLKLLSLWRIKNGDQDTLKGLMHALK	350
muosteo.frg	HLKTSHFPKKTVTHSSLRKTMRFLHSFTMYRLYQKLLFLEMIGNQVQSVKISC	400
ratosteo.frg	HLKAYHFPKKTVTHSSLRKTIRFLHSFTMYRLYQKLLFLEMIGNQVQSVKISC	400
huosteo.frg	HSKTYHFPKKTVTQSLKKTIRFLHSFTMYKLLYQKLLFLEMIGNQVQSVKISC	400
muosteo.frg	L	401
ratosteo.frg	L	401
huosteo.frg	L	401

FIG.10

ltnrr	C	P	Q	-	G	K	Y	I	H	P	Q	N	N	S	I	C	C	T	K	C	H	K	G	T	Y	L	Y	N	D	C	P	G	P	G	Q	D	T	D	C	R	E	C	E	S	G	S	E	T	A	S	49
humoste	P	P	K	Y	L	H	Y	D	E	E	T	S	H	Q	L	L	C	D	K	C	P	P	G	T	Y	L	K	Q	H	C	T	A	K	-	W	K	T	V	C	A	P	C	P	D	H	Y	T	D	S	49	
ltnrr	E	N	H	L	R	H	C	L	S	C	S	-	K	C	R	K	E	M	G	Q	V	E	I	S	S	C	T	V	D	R	D	T	V	C	G	C	R	K	N	Q	Y	R	H	Y	W	S	E	N	L	E	98
humoste	W	H	T	S	D	E	C	L	Y	C	S	P	V	C	-	K	E	L	Q	Y	V	K	-	Q	E	C	N	R	T	H	N	R	V	C	E	C	K	E	G	R	Y	L	E	I	-	-	E	-	E	93	
ltnrr	Q	C	F	N	C	S	L	C	L	N	G	-	T	V	H	L	S	C	Q	E	K	Q	N	T	V	C	T	-	C	H	A	G	F	F	L	R	E	-	-	-	N	E	C	V	S	C	139				
humoste	-	C	L	K	H	R	S	C	P	P	G	F	G	V	V	Q	A	G	T	P	E	R	N	T	V	C	K	R	C	P	D	G	F	F	S	N	E	T	S	S	K	A	P	C	R	K	H	139			

【図11】

FIG.11

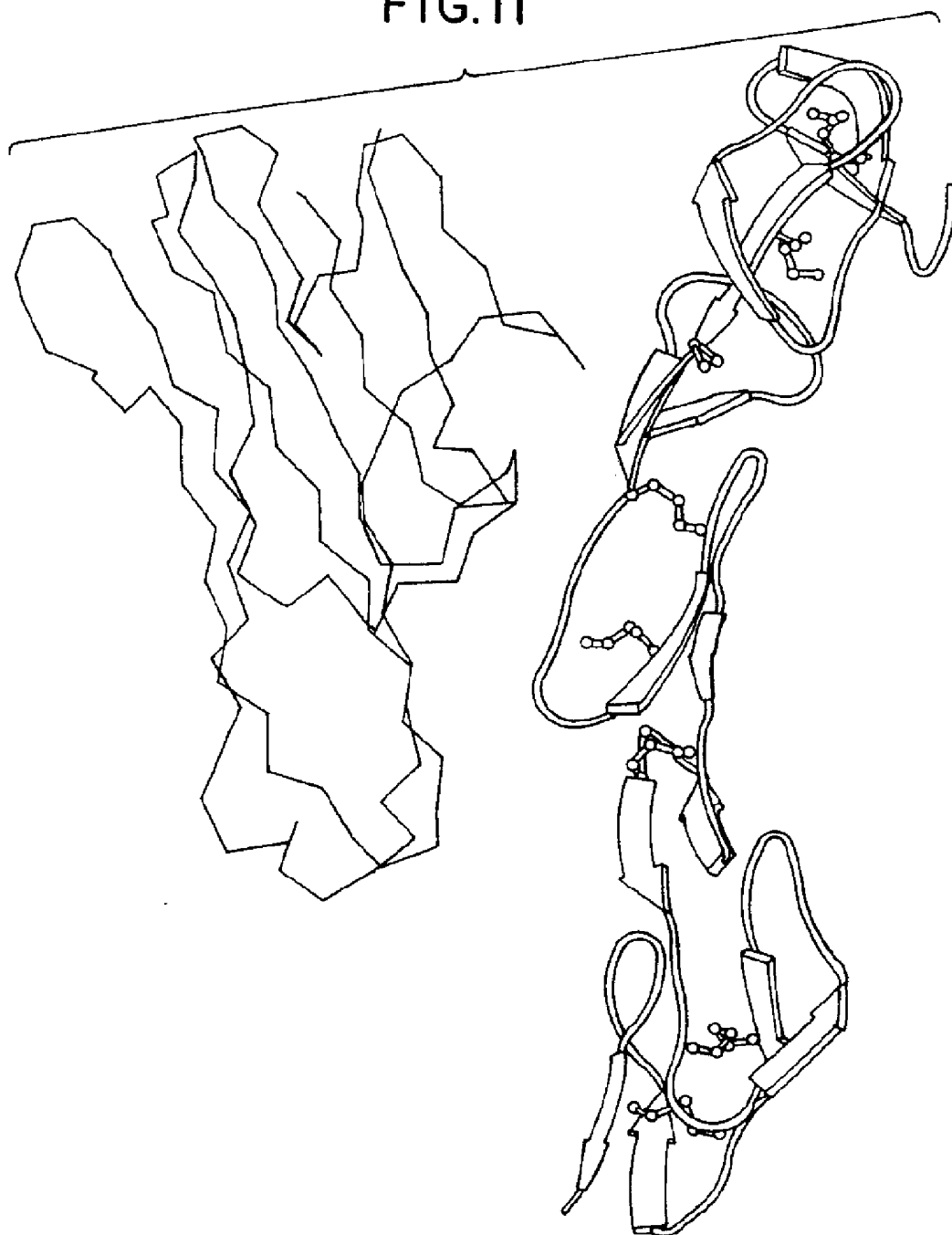


FIG.12A

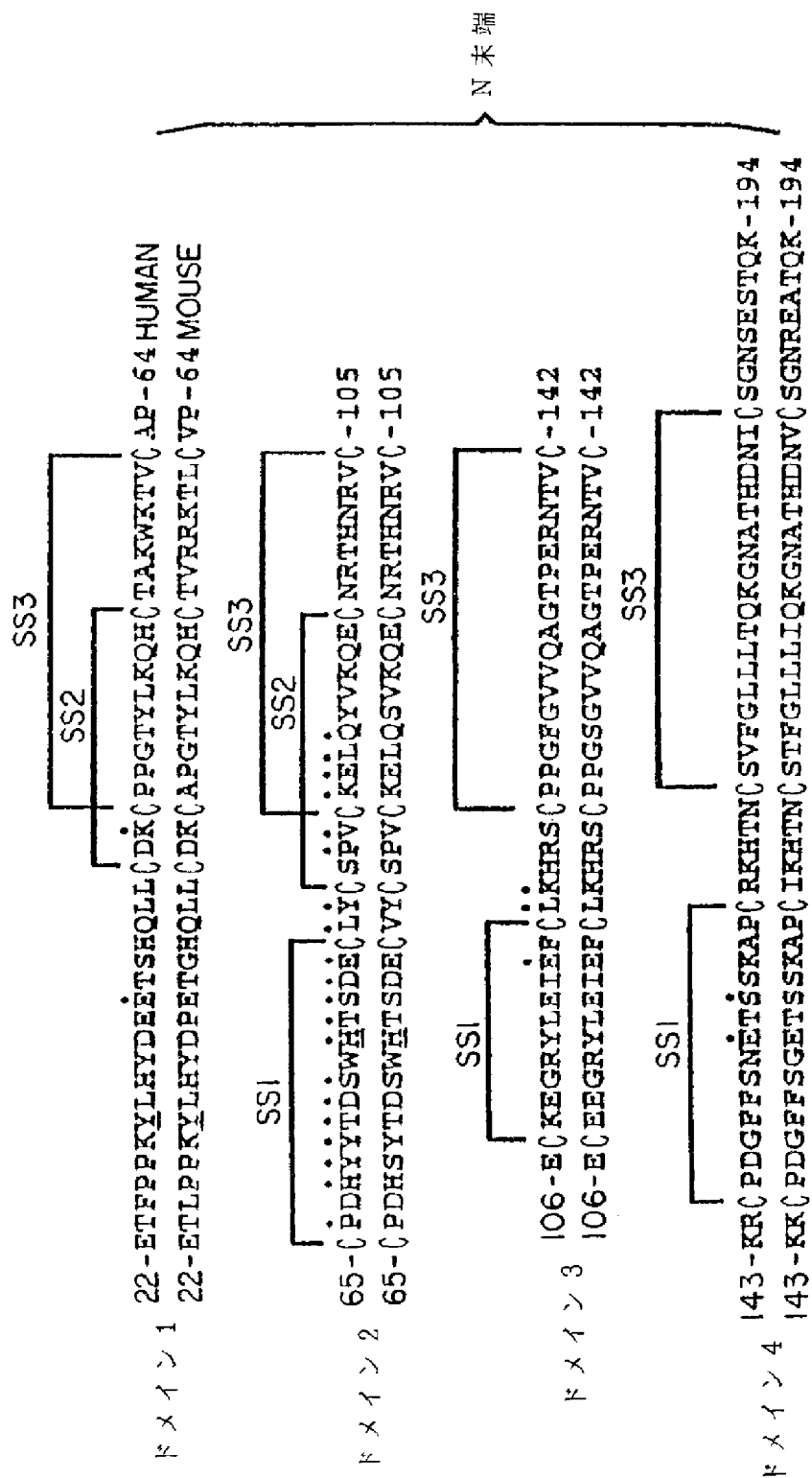


FIG.12B

195 -CGIDVTLC¹EEAFFRFAVPTKPTPNWLSVLVDNLPGTKVNAESVERIKRQHSS-246
 195 -CGIDVTLC¹EEAFFRFAVPTKIIIPNWLSVLVDSLPGTKVNAESVERIKRRHSS-246
 247 -QEQTFFQLLKLWKHQNKDDIVKKIIQDIDLC¹ENSVQRHIGHANLTPEQLRSL-298
 247 -QEQTFFQLLKLWKHQNRDQEMVKKIIQDIDLC¹ESSVQRHLGHSNLTTEQLLAL-298
 299 -MESLPGKKVGAEDIEKTIKAC¹KPSDQILKLLSLWRIKNGDQDTLKGLMHALK-350
 299 -MESLPGKKISPEEIERTRKT¹CSSEQLLKL¹SLWRIKNGDQDTLKGLMYALK-350
 351 -HSKTYHFPKTVTQSLKKTIRFLHSFTMYKLYQKLFLEMIGNQVQSVKIS¹CL-401
 351 -HLKTSHPKTVTHSLRKTMRFLHSFTMYRLYQKLFLEMIGNQVQSVKIS¹CL-401

C 末端

【図13】

FIG.13A

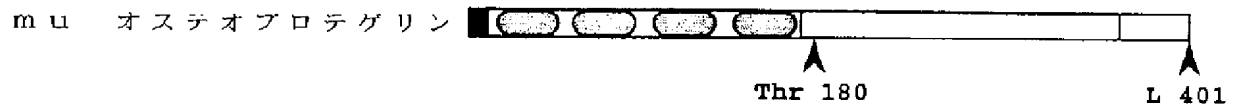


FIG.13B

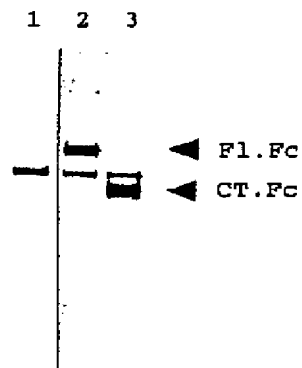


FIG.13C

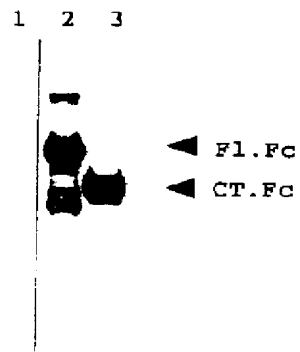
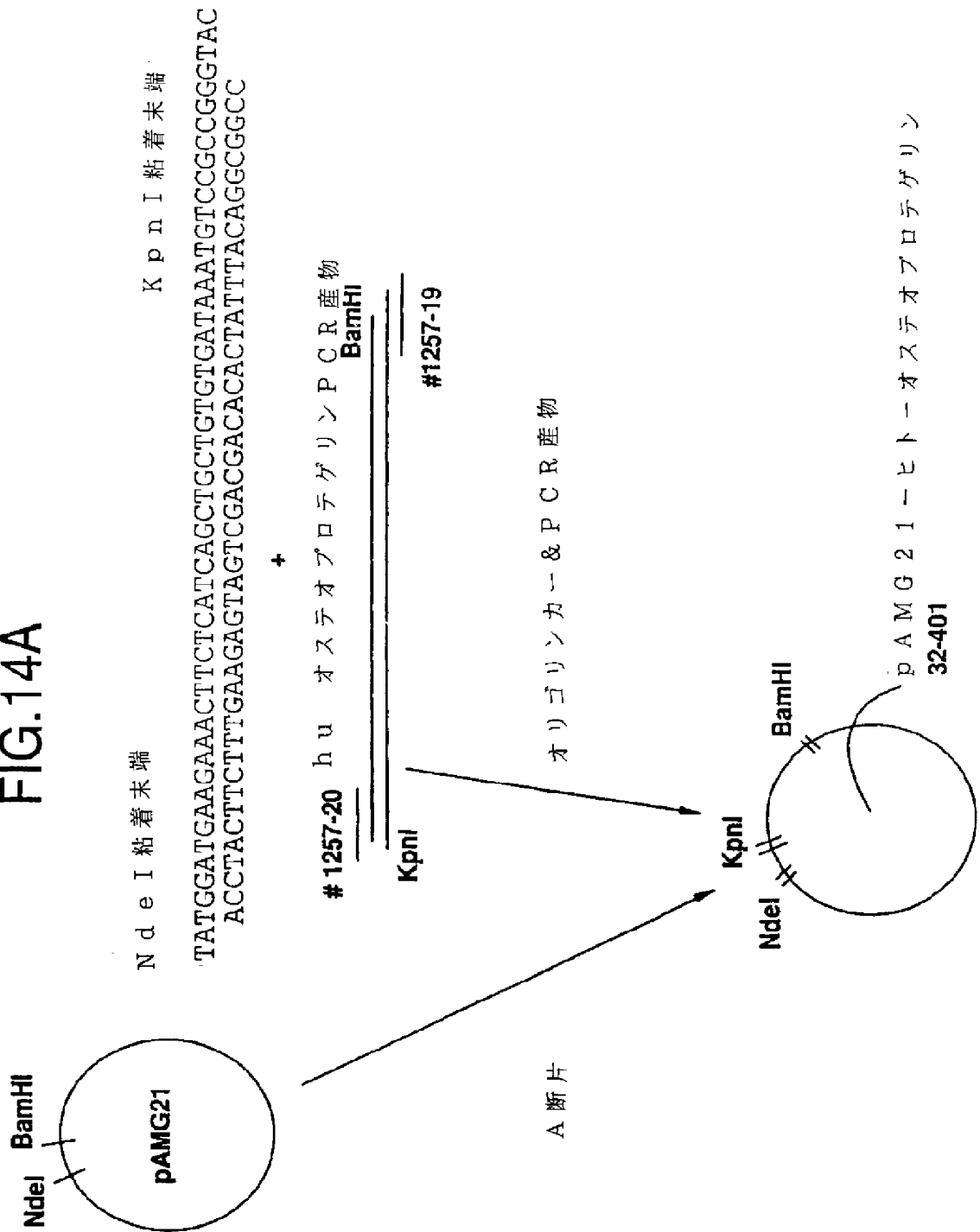


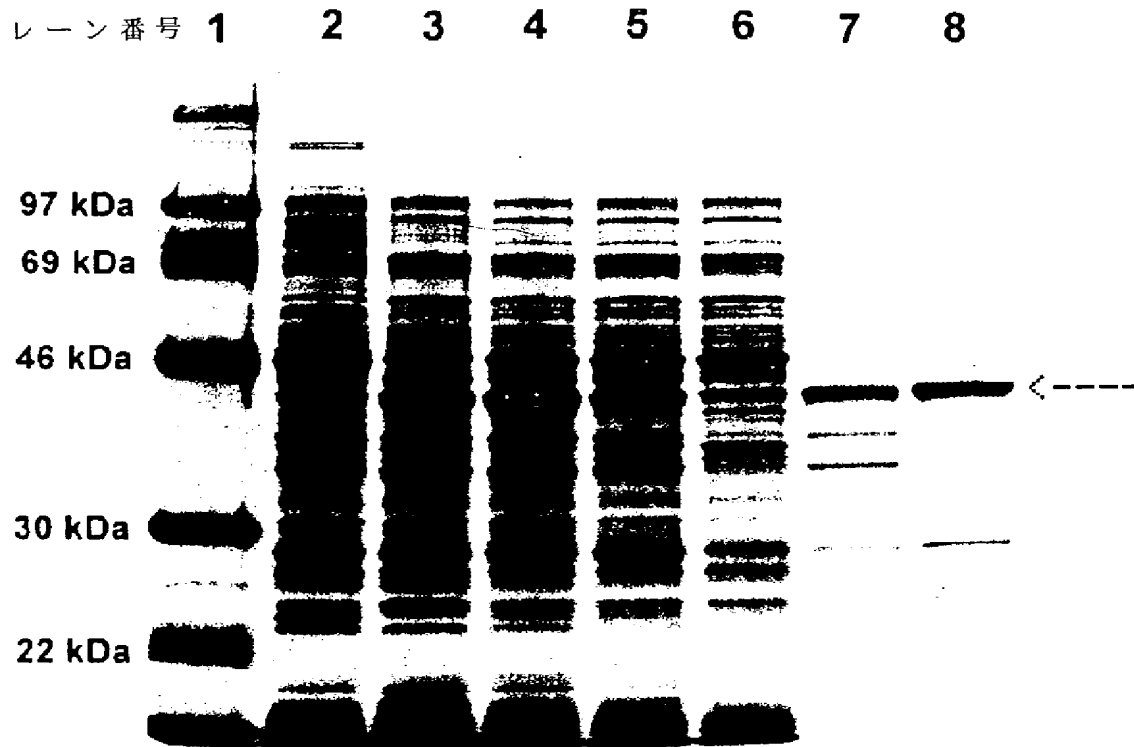
FIG.14A

【図14】



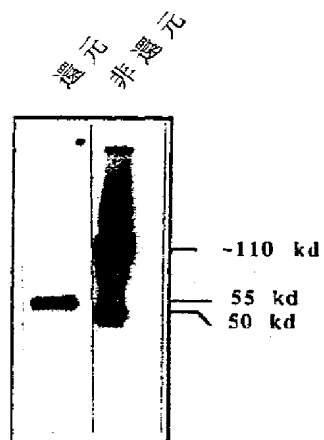
【図14】

FIG.14B



【図15】

FIG.15



【図16】

FIG.16A

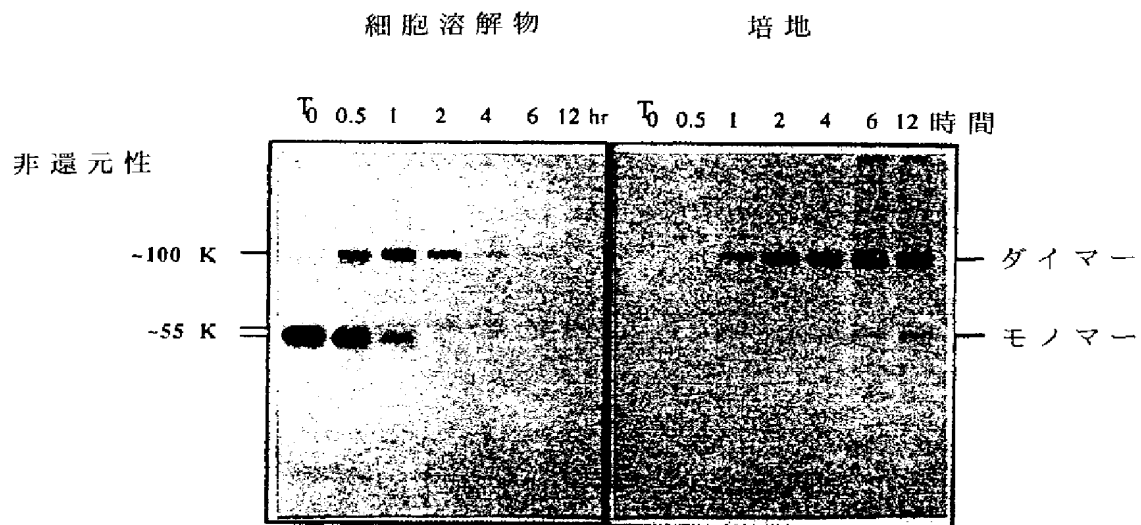
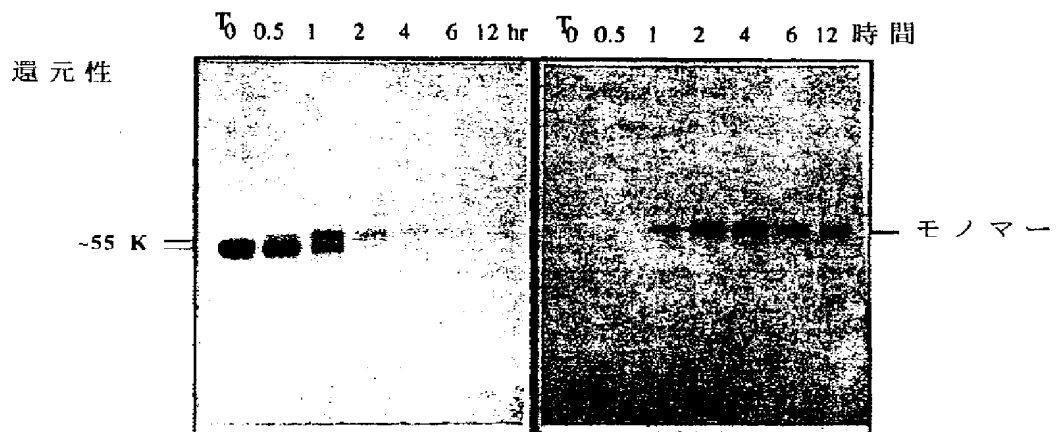
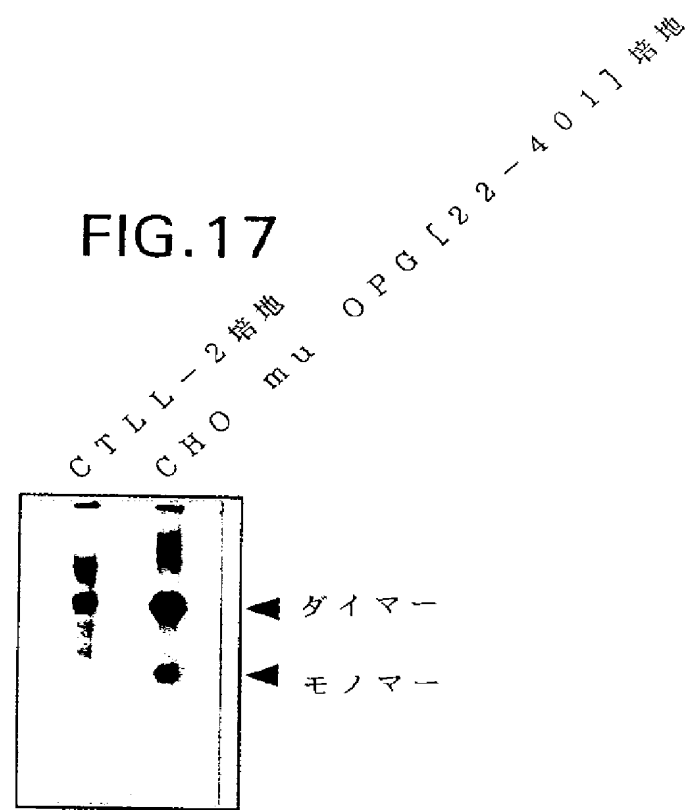


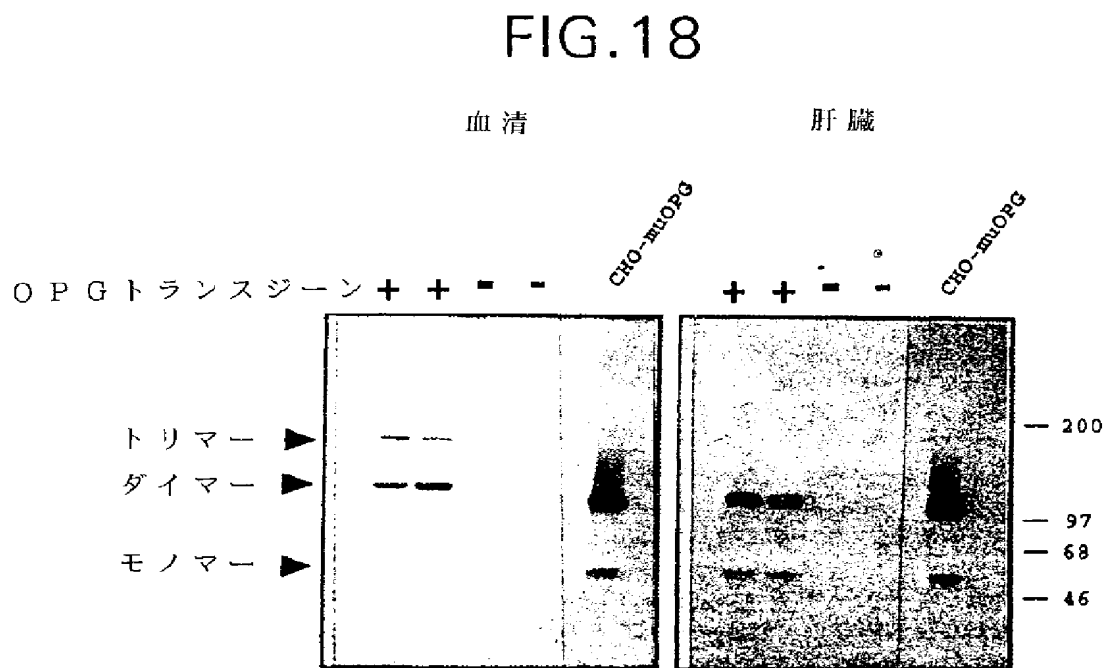
FIG.16B



【図17】



【図18】



【図19】

FIG.19A

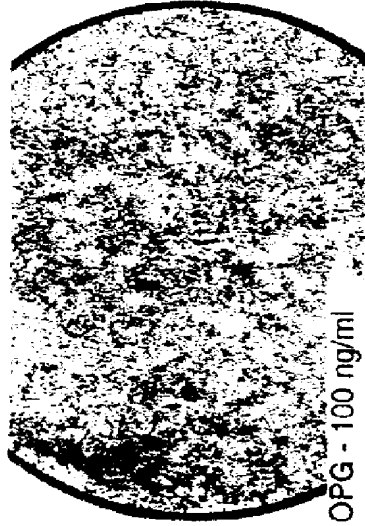


FIG.19B

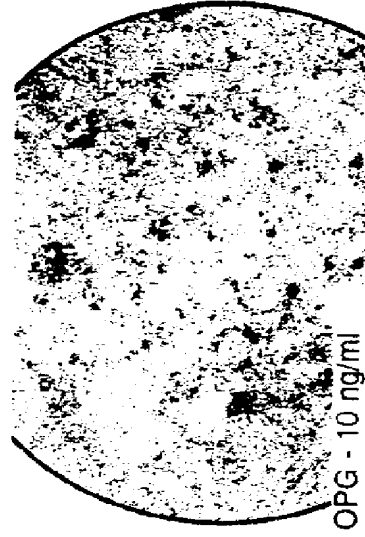


FIG.19C

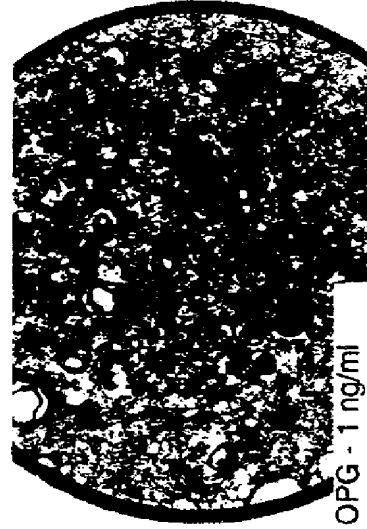
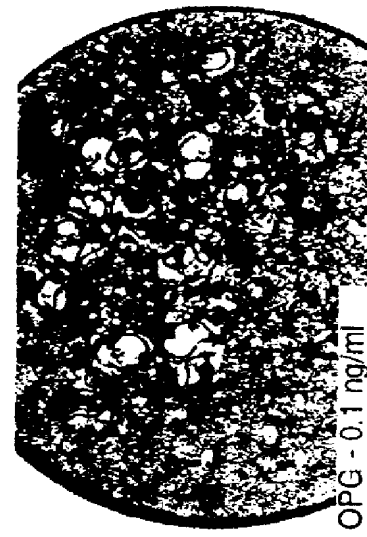


FIG.19D



【图19】

FIG.19E

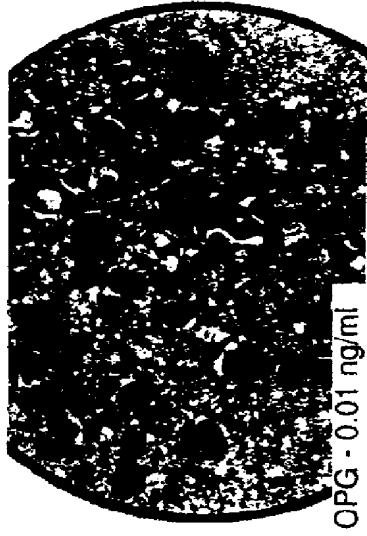


FIG.19F

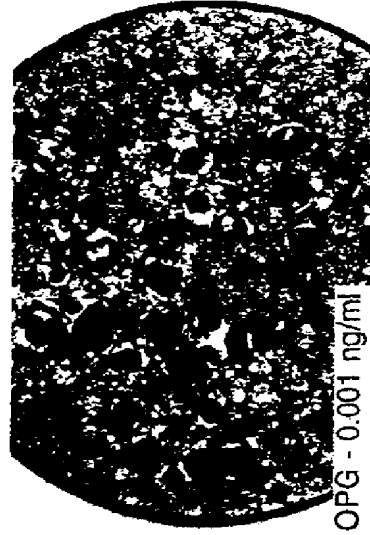
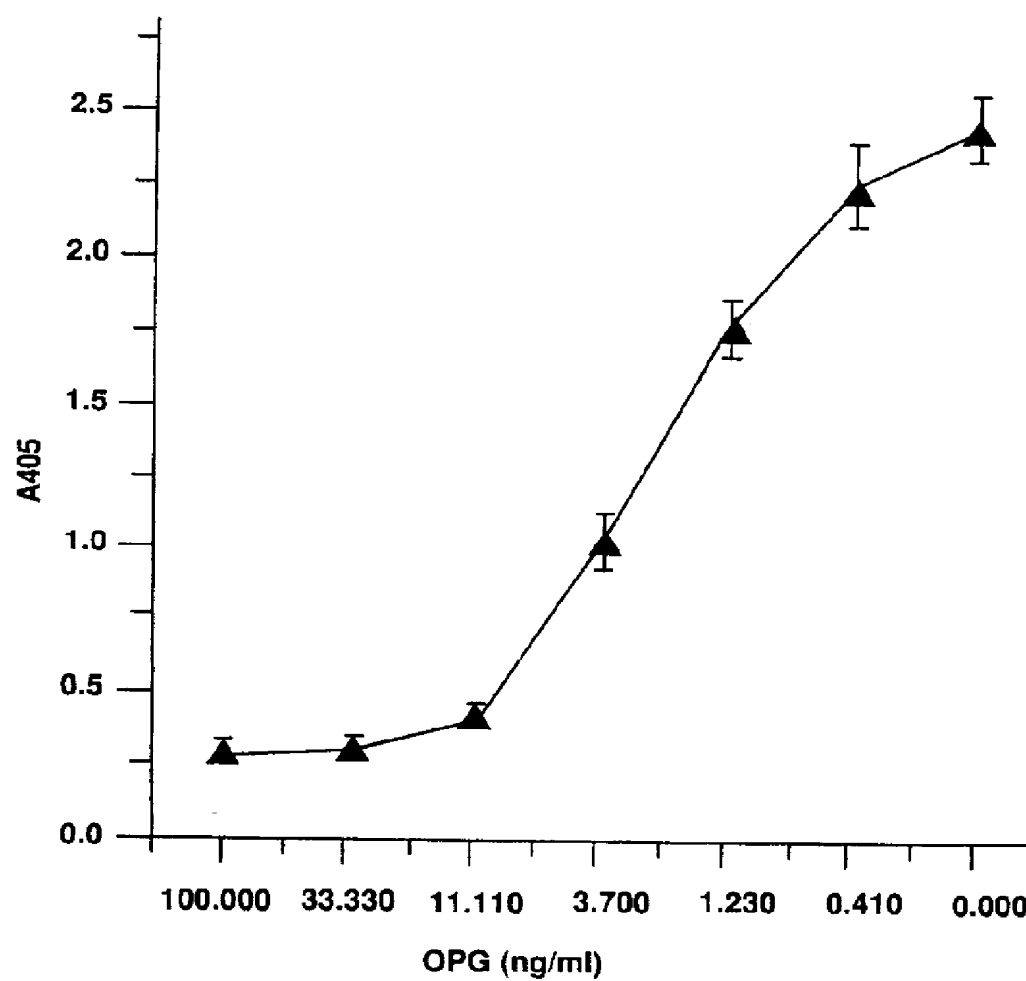


FIG.19G



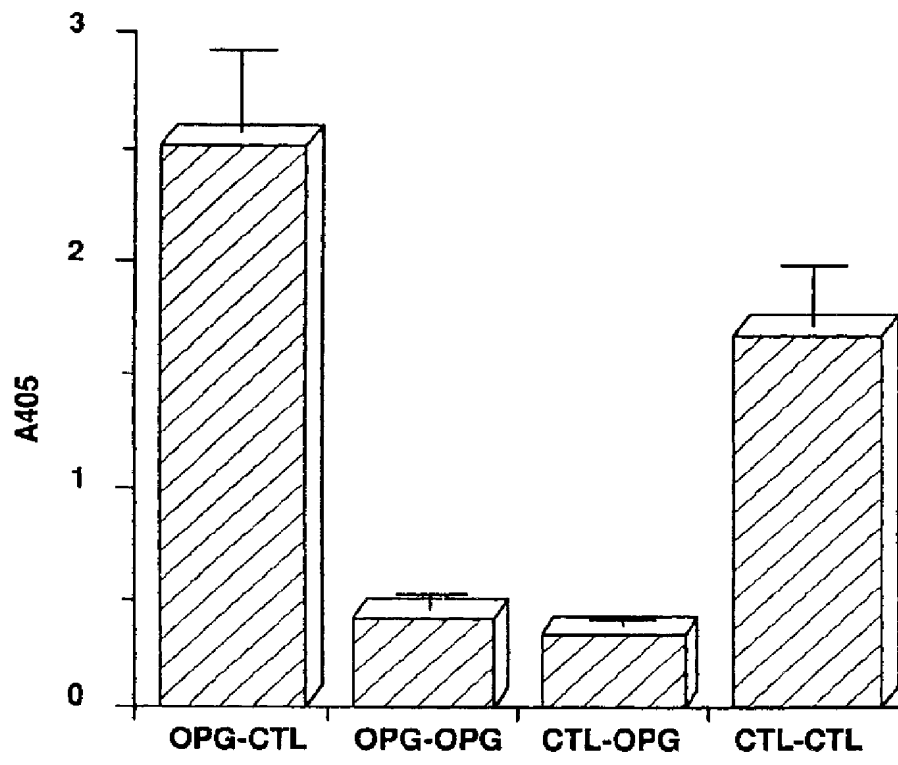
【図20】

FIG.20



【図 21】

FIG.21



記号説明

増殖
骨髄細胞

中間
PGE2 + CSF-1

終末
S T 2 細胞
1,25 (OH)2 D3
デキサメタゾン

CSF -1

4 日

2 日

8 - 10 日

群

CTL - CTL
OPG - CTL
OPG - OPG
OPG - OPG

OPG

100 ng/ml

100 ng/ml

OPG

100 ng/ml
100 ng/ml

【図22】

FIG.22A

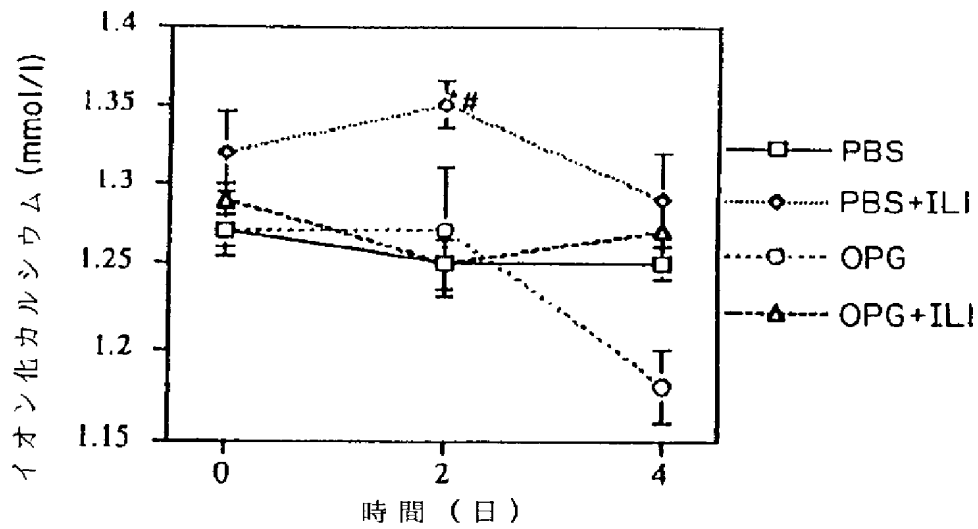
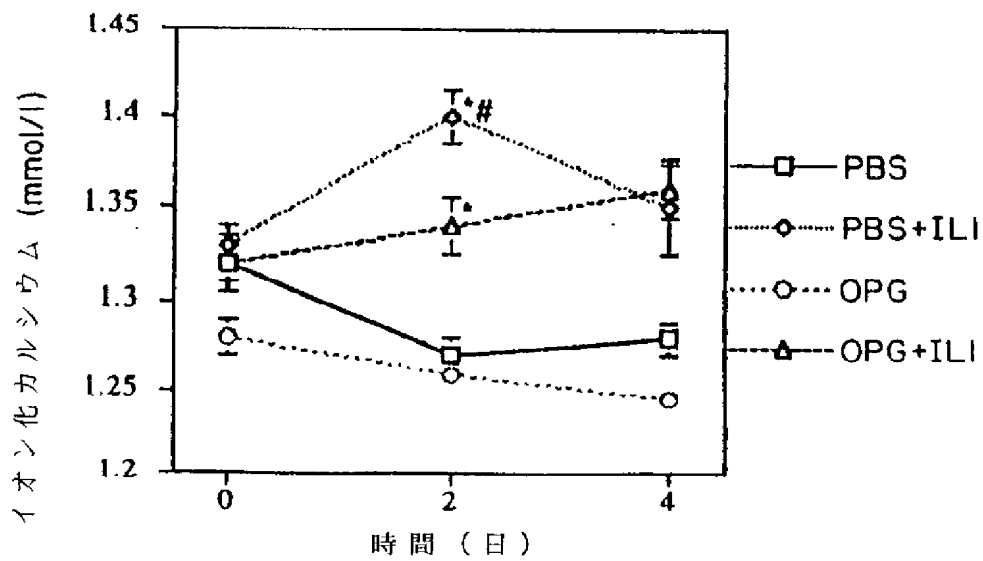


FIG.22B



* PBS に対し異なる, $p < 0.05$

OPG + IL1 に対して異なる, $p < 0.05$

【図23】

FIG.23A

PBS/PBS



FIG.23B

IL1/PBS



【図23】

FIG.23C

PBS/OPG

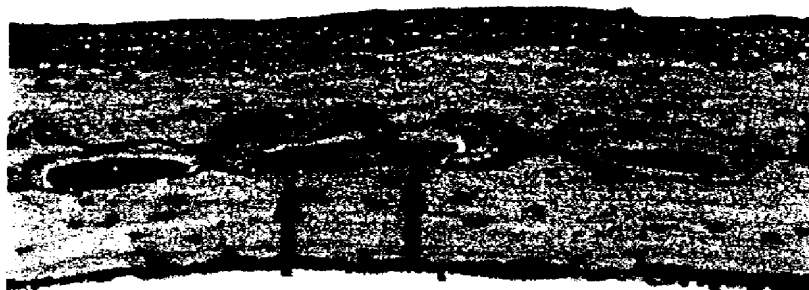
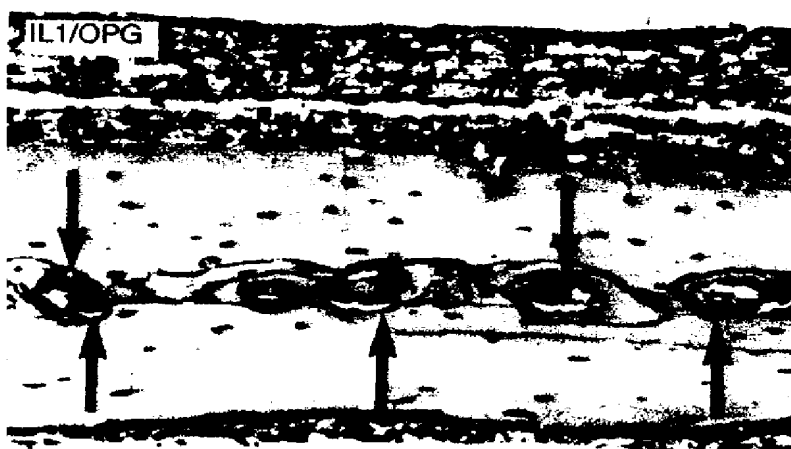


FIG.23D



【図24】

FIG.24B

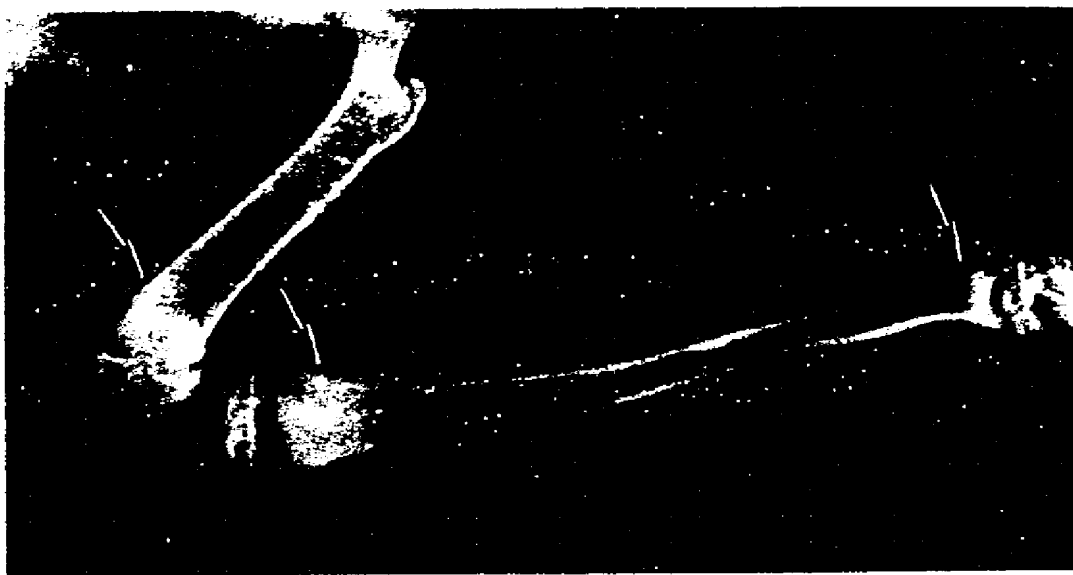
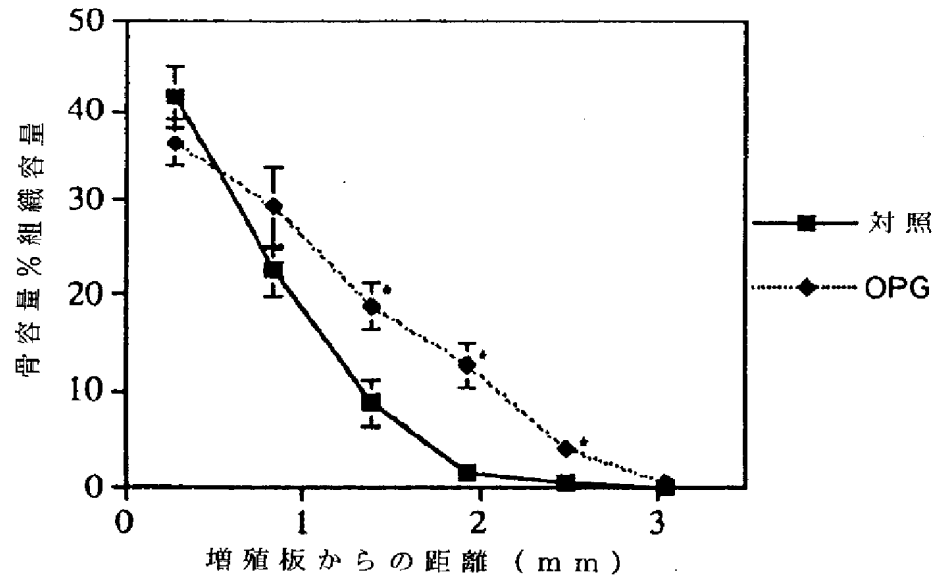


FIG.24A



【図 25】

FIG.25



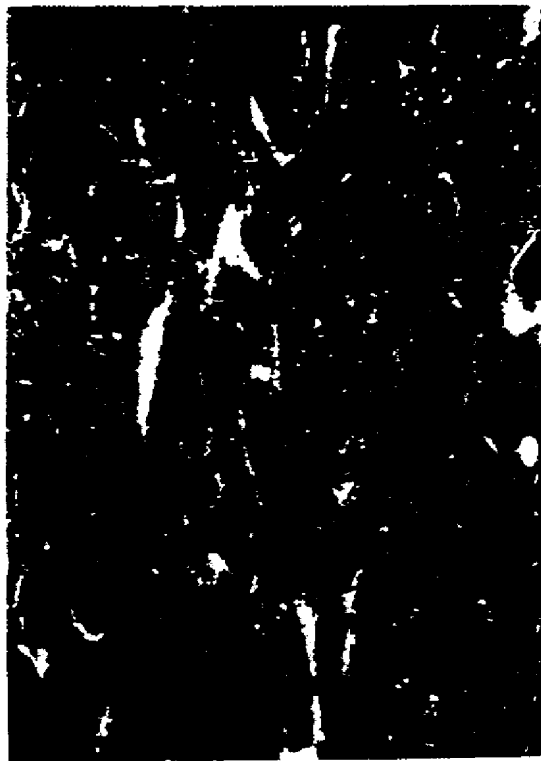
* 対照に対して異なる $p < 0.01$

【図26】

FIG.26A

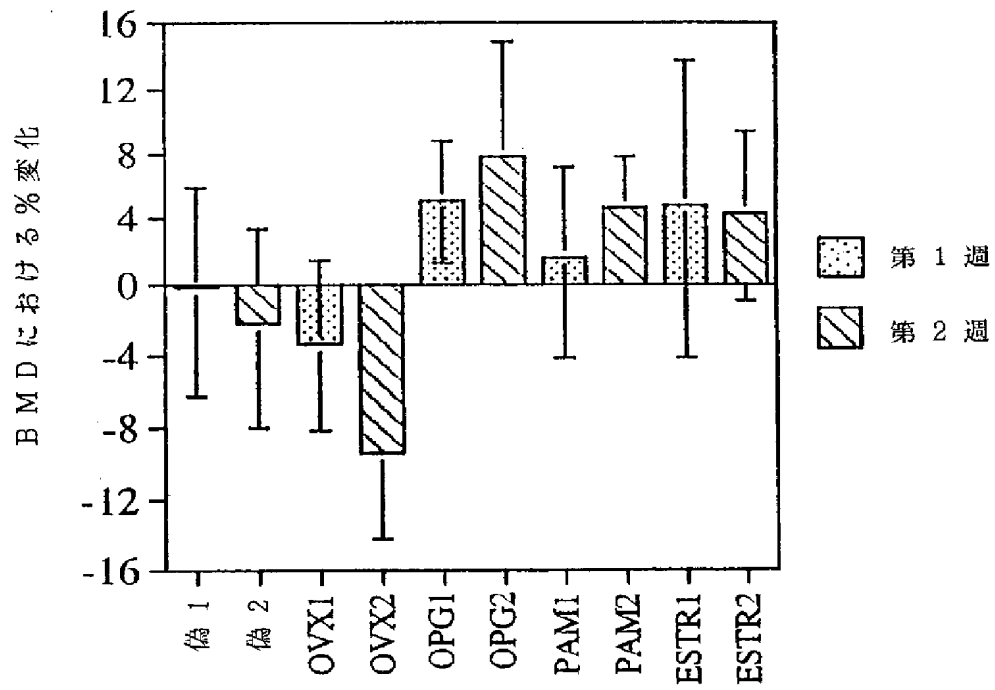


FIG.26.B



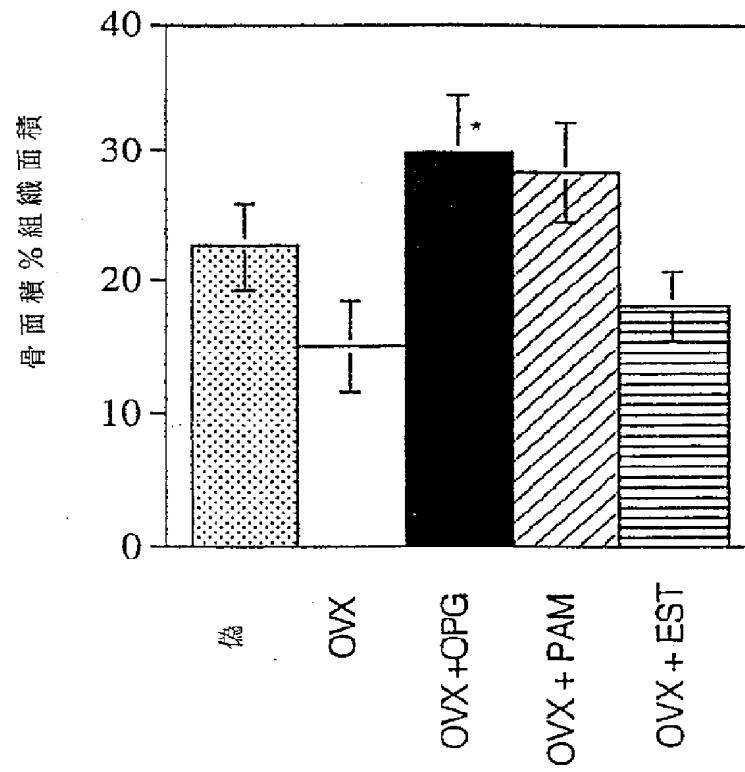
【図 27】

FIG.27



【図28】

FIG.28



* OVX に対して異なる $p < 0.05$

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/US 96/20621				
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N15/12 C07K14/715 C12N5/10 A01K67/027 C07K19/00 C12N15/62 C07K16/28 C07K1/107 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/566 A61K38/17 A61K48/00 C12N1/21 //(C12N1/21, According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N C07K A01K C12Q G01N A61K Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
A	CELL, vol. 75, 25 March 1994, pages 959-962, XP002029050 SMITH C.A. ET AL.: "The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death." cited in the application see the whole document ---	1-60		
A	PROC.NATL.ACAD.SCI.USA, vol. 88, 1991, pages 2830-2834, XP002029051 LEWIS M. ET AL.: "Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific." see figure 1 ---	1-60		
-/--				
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family				
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report		
9 April 1997		16. 04. 97		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3015		Authorized officer Mandl, B		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12R1:19)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCIENCE, vol. 252, 1991, pages 1651-1656, XP000645049 ADAMS M.D.: "Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project." cited in the application see the whole document	1-60
A	US 5 447 851 A (BEUTLER BRUCE A ET AL) 5 September 1995 see the whole document	36-38,57
A	US 4 179 337 A (DAVIS FRANK F ET AL) 18 December 1979 cited in the application see the whole document	28,29
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fac. (+31-70) 340-3016		Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 96/20621

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 43-45, 49-53
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although these claims are directed to a method of treatment of (diagnostic method practised on) the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PC1/US 96/20621

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5447851 A	05-09-95	NONE	
US 4179337 A	18-12-79	CA 1033673 A	27-06-78
		CH 616942 A	30-04-80
		DE 2433883 A	05-02-76
		FR 2313939 A	07-01-77
		GB 1469472 A	06-04-77
		JP 1152589 C	30-06-83
		JP 50042087 A	16-04-75
		JP 56023587 B	01-06-81
		NL 7409770 A	22-01-75
		SE 441753 B	04-11-85
		SE 7409366 A	21-01-75

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	F I	
C 0 7 K	14/715	C 0 7 K	16/28
	16/28		19/00
	19/00	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	1/21	C 1 2 P	21/02
	5/10	C 1 2 Q	1/68
C 1 2 P	21/02	G 0 1 N	33/15
C 1 2 Q	1/68		33/53
G 0 1 N	33/15	C 1 2 P	21/08
	33/53	C 1 2 N	5/00
// C 1 2 P	21/08	A 6 1 K	37/02
(C 1 2 N	1/21		
C 1 2 R	1:19)		
(C 1 2 P	21/02		
C 1 2 R	1:91)		
(C 1 2 P	21/02		
C 1 2 R	1:19)		
(81)指定国	EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN		
(72)発明者	カルゾーン, フランク・ジェイ		
	アメリカ合衆国、カリフォルニア、ウエストレイク・ビレッジ、リム・クレスト・サークル・841		
(72)発明者	チヤン, ミン・シ		
	アメリカ合衆国、カリフォルニア、ニューバリー・パーク、カレ・ラス・コリナス・736		